

Efeitos De Doses Controladas Do Suplemento OxyElite Pro Sobre a Performance Física em Ratos Wistar

Paulo Vinicios Camuzi Zovico

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Abril de 2017

PAULO VINICIOS CAMUZI ZOVICO

Efeitos De Doses Controladas Do Suplemento OxyElite Pro Sobre a Performance Física em Ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valério Garrone Barauna

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Abril de 2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO CANDIDATO
PAULO VINICIOS CAMUZI ZOVICO AO TÍTULO DE MESTRE PELO
PPGCF/CCS/UFES

Nº. Matrícula do Candidato: 2015130662

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado, intitulada “**Efeitos de Doses Controladas do Suplemento OxyElite Pro Sobre a Performance Física em Ratos Wistar**”, apresentada e defendida publicamente pelo aluno **Paulo Vinicios Camuzi Zovico**, no dia 26 de abril de 2017, às 14h, decidiu por unanimidade, aprovar a referida dissertação de Mestrado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 26 de abril de 2017.

Prof. Dr. Nuno Manuel Frade de Sousa
Faculdade Estácio de Sá
Membro externo

Prof. Dr. Rafael de Oliveira Alvim
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
Membro externo

Prof. Dr^a. Livia Carla de Melo Rodrigues
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
Membro interno

Prof. Dr. Valério Garrone Baraúna
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
Orientador

Zovico, Paulo Vinicios Camuzi

Efeitos de doses controladas do suplemento OxyElite Pro sobre a performance física em ratos Wistar/ Paulo Vinicios Camuzi Zovico. – Vitória, UFES/ PPGCF, 2017

91f

Orientador: Prof. Dr. Valério Garrone Baraúna

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

1. Suplementos alimentares 2. Performance física 3. Fígado 4. Estresse oxidativo 5. Biogêneses mitocondrial

Dedico esta dissertação de mestrado, com muito carinho e gratidão, à minha família, amigos e professores por toda compreensão e apoio durante toda esta trajetória.

Em especial à Juliana do Nascimento Camara, por todo apoio, cuidado, paciência e todos os momentos em que eu não estive presente e ao meu filho Heitor Camuzi Camara Zovico, se não fosse por todo apoio de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Obrigado por acreditarem em todos os meus objetivos!

Meu especial agradecimento ao meu orientador Valério Garrone Baraúna, que me proporcionou está incrível experiência, por me acolher com muita consideração, respeito e confiança durante todo o projeto. Com palavras não conseguiria expressar minha gratidão.

Doctor muito obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

A caminhada não foi fácil, apenas parte dos meus objetivos está sendo concluído neste momento, ainda tenho um longo caminho a percorrer para chegar ao real objetivo. Porém, mais uma etapa está sendo concluída, foram muitas ideais, aprendizados, emoções, experimentos, leituras e escritas nestes dois anos de mestrado, muitos fizeram parte deste turbilhão de sentimentos, seja de forma direta ou indireta e neste momento gostaria de demonstrar todos os meus sentimentos de carinho e gratidão.

A palavra agradecimento significa reconhecimento, é uma declaração de se estar grato por algo dado ou feito por outrem. Se torna fácil entender quando se ler no dicionário, porém, o sentimento de gratidão vai muito além desta simples palavra e até mesmo a compreensão da mesma. Com todo respeito, admiração e carinho os meus mais que sinceros e especiais agradecimentos para todos aqueles que tornaram possíveis todas as minhas impossibilidades.

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus por iluminar e me abençoar em todos os momentos deste processo. De me dar paciência e sabedoria para lidar com todas as dificuldades encontradas no caminho durante esta formação pessoal e profissional, de fato, não foi fácil passar por tudo, porém nunca perdi a fé e a esperança que iria dar tudo certo no final.

Meus agradecimentos mais que especial a minha esposa Juliana do Nascimento Camara e ao meu amado filho Heitor Camuzi Camara Zovico, os quais não pouparam esforços para que eu fosse capaz de chegar a este objetivo. Obrigado por me ajudar de todas as formas possíveis na qual uma pessoa possa ser ajudada, sem vocês eu não teria conseguido. Ainda milhões de desculpas não seriam suficiente por todas as vezes em que estive ausente em suas vidas, seja elas nas horas boas ou ruins, foi difícil eu sei, mas tenho certeza que irá valer a pena.

A minha imensa gratidão, admiração e carinho ao meu orientador Dr. Valério Garrone Baraúna, muito obrigado pela oportunidade e por ter me acolhido de forma tão confiante. Obrigado por toda orientação, compreensão, aprendizado e por me fazer enxergar a ciência de forma tão crítica e com muita paixão durante todo o

mestrado. Sou eternamente grato pela oportunidade e por todo aprendizado adquirido sob a sua orientação.

A todos os professores que contribuíram pelo sucesso desta caminhada: Dr^a. Paula Frizera Vassalo, Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles, Dr. Elisardo Corral Vasquez Dr^a. Ágata Lages Gava, Dr^a. Livia Carla de Melo Rodrigues, Dr. Daniel Ventura Dias e Dr^a Edilamar Menezes de Oliveira por suas colaborações, conhecimentos, ideias, paciência e sabedoria, além de ter me acolhido de forma tão carinhosa e prestativa em seus laboratórios.

Aos meus queridos amigos de todas as horas que não pouparam esforços para me ajudaram tanto de forma indireta ou direta durante estes dois anos, além de terem tornado esses anos mais divertidos e produtivos: Victor, Eduardo, Marquinhos, Bruna Coelho, Hadassa, Ricardo, Rose, Ananda, Rossana, Brunella, Jamila, Fran, Brenna entre muitos outros que contribuíram com este projeto.

A todos os alunos e funcionários dos laboratórios de: Fisiologia Translacional, Regulação Neuro Humoral da Circulação, Neurotoxicologia e Psicofarmacologia, Imunopatologia e Multiusuário de Análises Biomoleculares que sempre estiveram de portas abertas para me atender.

A todos os professores e funcionários do PPGCF/UFES.

A toda minha família que nunca me deixaram desistir, em especial aos meus pais Vera Lúcia Camuzi e José Márcio da Fonseca. Obrigado por todos os ensinamentos e por contribuírem para a formação do homem que hoje sou. Aos meus irmãos em especial a Vitor Camuzi Zovico que esteve presente em todo este processo. A todos os outros familiares, os quais torceram por mim e ficaram felizes por todas as minhas conquistas.

Meus sinceros agradecimentos a toda família da minha esposa, em especial a Elisabete do Nascimento Camara, Jocimar Sartório Camara, Jair José da Camara Neto e Jocieli Fonseca do Nascimento que em todos os momentos estiveram sempre presentes ajudando sempre que possível. Minha imensa gratidão á todos vocês.

Ao apoio financeiro da CAPES e FAPES, a BIOCLIN pelos kits fornecidos para realização dos testes, o meu muito obrigado.

A todos as pessoas que de certo modo participaram desta longa caminhada, meus mais sinceros agradecimentos!

“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes”.
(Martin Luther King)

RESUMO

OxyElite Pro (OEP) é um suplemento alimentar vendido com objetivo de aumentar o metabolismo e contém como principal ingrediente a 1,3-dimetilamilamina (DMAA). Efeitos adversos após o consumo de OEP têm sido relatados. Contudo, estes efeitos estão relacionados com doses desconhecidas ou sobredosagem do produto. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos agudos e crônicos de OEP em doses controladas em ratos Wistar sobre: desempenho físico, respostas hemodinâmicas, atividade locomotora espontânea, parâmetros comportamentais, parâmetros metabólicos, marcadores de lesão hepática, marcadores de estresse oxidativo e biogênese mitocondrial no músculo esquelético. Para isso utilizamos os seguintes grupos de ratos: controle, 4,3 mg/kg de OEP (dose mínima recomendada), 12,9 mg/kg de OEP (dose máxima recomendada) e 25,8 mg/kg de OEP (não recomendada). Todos os grupos foram submetidos a suplementação com OEP durante 4 semanas e os protocolos experimentais foram realizados 30 minutos após a primeira administração de OEP (resposta aguda) e 30 minutos após a última administração de OEP no final da quarta semana (resposta crônica). Observou-se que a distância e o tempo de corrida aumentaram após administração aguda com 12,9 mg/kg de OEP (2,6 vezes) e 25,8 mg/kg de OEP (2,8 vezes). Uma vez que não foi observado qualquer efeito no teste de tolerância ao exercício à dose mais baixa de OEP (4,3 mg/kg de OEP), este grupo foi removido de outras análises. A suplementação aguda com 12,9 mg/kg de OEP foi capaz de aumentar a frequência cardíaca (FC) sem afetar a pressão arterial (PA) de modo significativo, entretanto, doses não recomendadas (25,8 mg/kg de OEP) apresentou um aumento na PA e FC. Por outro lado, a distância e o tempo de corrida diminuíram após a suplementação diária durante 4 semanas de ambos os grupos (64% no grupo 12,9 mg/kg de OEP e 72% no grupo 25,8 mg/kg de OEP). A suplementação crônica com 12,9 e 25,8 mg/kg de OEP diminuiu os níveis de TBARS no músculo sóleo (36 e 31%) e no fígado (43 e 25%). A AOPP também diminuiu com ambas as doses no fígado (39 e 45%). A administração crônica com a dose mais elevada, 25,8 mg/kg de OEP, foi capaz de reduzir a expressão gênica da PGC-1 α no músculo sóleo (25%). Nenhum efeito foi encontrado nas outras variáveis analisadas, tais como: atividade locomotora espontânea, parâmetros comportamentais, peso corporal, ingestão de ração e água, toxicidade hepática e na quantidade de DNA mitocondrial. Concluimos

portanto que, doses máximas e não recomendadas de OEP ingeridas de forma aguda apresenta efeito estimulante sobre a capacidade de exercício. Doses não recomendadas com OEP aumenta de forma significativa as respostas hemodinâmicas (PA e FC). No entanto, o seu consumo diário durante 4 semanas causa efeitos antioxidantes no músculo sóleo e no fígado, o que pode ter levado a supressão da expressão do RNAm da PGC-1 α no músculo sóleo e ter contribuído parcialmente para um desempenho físico prejudicado no teste de tolerância ao exercício.

Palavras-chave: Suplementos alimentares, Desempenho, Fígado, Estresse oxidativo, Biogênese mitocondrial.

ABSTRACT

OxyElite Pro (OEP) is a dietary supplement to increase metabolism which contains as key stimulant the ingredient 1,3-dimethylamylamine (DMAA). Serious adverse effects have been reported after OEP consumption. However, these effects are related to unknown doses or overdose of supplement. Thus, the aim of this study was to evaluate acute and chronic OEP affects, at controlled doses in Wistar rats, on physical performance, hemodynamic responses, spontaneous locomotor activity, behavioral parameters and metabolic parameters, liver injury markers and oxidative stress markers, and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. For this we use the following groups of rats: control, 4,3 mg OEP/kg (minimum dose), 12,9 mg OEP/kg (maximum dose) and 25,8 mg OEP/kg (not recommended). All groups were submitted to supplementation with OEP for 4 weeks and the experimental protocols were performed 30 min after the first OEP administration (acute response) and 30 min after the last OEP administration at the end of the fourth week (chronic response). Running distance and running time increased after acute administration of 12,9 mg OEP/kg (2.6-fold) and 25,8 mg OEP/kg (2,8-fold). Since no effect on the exercise tolerance test was observed at the lower OEP dose (4,3 mg OEP/kg), this group was removed from further analyzes. Acute supplementation with 12,9 mg/kg OEP was able to increase HR without significantly affecting blood pressure (BP), however, non-recommended doses (25,8 mg/kg OEP) showed an increase in BP and HR. On other hand, running distance and running time decreased after daily supplementation for 4 weeks also in both groups (64% in 12,9 mg OEP/kg and 72% in 25,8 mg OEP/kg). Chronic supplementation at both 12,9 and 25,8 mg OEP/kg decreased TBARS levels in soleus muscle (36 and 31%) and liver (43 and 25%). AOPP was also decreased by both doses in the liver (39 and 45%). Chronic administration of the highest dose, 25,8 mg OEP/kg, was able to reduce mRNA expression of PGC-1 α in soleus muscle (25%). No effect was found in other variables such as spontaneous physical activity, behavioral parameters, body weight, food and water intake, hepatic toxicity, cardiac oxidative stress and mitochondrial DNA amount. Concluded that maximum and not recommended doses of OEP ingested acutely presented stimulating effect on the ability to exercise. Doses not recommended with OEP significantly increase hemodynamic responses. However, its daily consumption for 4 weeks showed antioxidant effects in soleus muscle and liver which may have

decreased the PGC-1 α mRNA expression on soleus muscle and contributed to the impaired performance in the exercise tolerance test.

Keywords: Dietary supplements, Performance, Liver, Oxidative stress, Mitochondrial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do 1, 3 dimetilamilamina (DMAA) relacionadas com anfetamina e metanfetamina.....	26
Figura 2 – Mecanismo de ação do DMAA sobre os diferentes tecidos do organismo de acordo com os dados descritos na literatura.....	27
Figura 3 – Alguns dos produtos comercializados que apresentava o ingrediente DMAA em suas formulações.....	29
Figura 4 – Rótulo do suplemento OxyElite Pro.....	30
Figura 5 – Esquema representativo do desenho experimental desenvolvido durante o projeto.....	37
Figura 6 – Foto representativa da esteira e do teste de tolerância ao exercício realizado neste projeto.....	40
Figura 7 – Gaiolas metabólicas individuais utilizadas para o teste de consumo alimentar.....	41
Figura 8 – Registro de um animal consciente realizado no presente estudo para avaliação dos efeitos da suplementação com OEP sobre as respostas hemodinâmicas.....	46
Figura 9 – Efeito da suplementação com OEP sobre a capacidade de exercício.....	50
Figura 10 – Efeito da suplementação com OEP sobre a atividade locomotora espontânea.....	51
Figura 11 – Efeito da suplementação com OEP sobre parâmetros comportamentais.....	52
Figura 12 – Efeito da suplementação com OEP sobre o ganho de peso corporal....	53
Figura 13 – Efeito da suplementação com OEP sobre o consumo alimentar.....	54
Figura 14 – Efeito da suplementação com OEP sobre os marcadores de lesões hepáticas.....	55
Figura 15 – Efeito da suplementação com OEP sobre os marcadores de estresse oxidativo circulante e tecidual.....	56
Figura 16 – Efeito da suplementação com OEP sobre os marcadores de biogênese mitocondrial.....	57

Figura 17 – Efeito da suplementação aguda com OEP sobre as repostas hemodinâmicas.....58

Figura 18 – Efeito da suplementação com OEP sobre a perda de pelos.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Velocidade percorrido por cada animal de acordo com o tempo durante o período do teste.....41

Tabela 2 – Efeito da suplementação crônica (4 semanas) com OEP sobre a massa tecidual.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

Abenutri: Associação Brasileira das Empresas de Produtos Nutricionais

ABIAD: Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Para Fins Especiais e Congêneres

Abifisa: Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde

AHPA: Associação Americana de Produtos Herbais

ALT: Alanina aminotransferase

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOPP: Produtos avançados da oxidação de proteínas

AST: Aspartato aminotransferase

CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais

DMAA: 1,3 dimetilamilamina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DP: Duplo produto

DSHEA: *Dietary Supplement Health and Education Act of 1994*

EPM: Erro padrão da média

FC: Frequência cardíaca

FDA: *Food and Drug Administration*

GAMA-GT: Gama-glutaminotransferase

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

KI: Iodeto de potássio

LCE: Labirinto em cruz elevado

LD₅₀: Dose Letal

MDA: Malondealdeído

NA: Noradrenalina

NRF-1: Fator respiratório nuclear-1

NRF-2 Fator respiratório nuclear-2

OEP: OxyElite Pro

PA: Pressão sanguínea arterial

PAM: Pressão arterial média

PAS: Pressão arterial diastólica

PAS: Pressão arterial sistólica

PBS: Solução de tampão fosfato

PGC-1 α : *Peroxisoma proliferator activated receptor coactivador 1 alpha*

PPGCF: Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

RNA: Ácido ribonucleico

RNAm: RNA mensageiro

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RT-PCR: *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*

SAMHSA: *Substance Abuse and Mental Health Services Administration*

SNC: Sistema Nervoso Central

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Tfam: Fator de transcrição A mitocondrial

TTE: Teste de tolerância ao exercício

Tween 20: Polioxietileno sorbitano 20

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UNPA: *United Natural Products Alliance*

WADA: Agência Mundial Antidoping

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 1,3 DIMETILAMILAMINA (DMAA)	25
1.1.1 Estrutura e nomenclatura do DMAA	26
1.1.2 Mecanismo de ação do DMAA	27
1.1.3 O DMAA possui origem natural?.....	28
1.2 PRODUTOS CONTENDO DMAA	28
1.2.1 Suplemento Oxyelite Pro (OEP)	29
1.2.2 Efeitos associados ao uso do DMAA isolado ou em produtos comercializados	30
1.2.3 Estudos clínicos com DMAA isolado ou como suplemento OEP.....	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	36
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	36
3.3 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DO SUPLEMENTO	38
3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	38
3.5 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	38
3.6 OPEN FIELD	39
3.7 TESTE DE TOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO (TTE)	39
3.8 GAIOLA METABÓLICA	41
3.9 SACRIFÍCIO E COLETA DE TECIDOS	42
3.10 TOXICIDADE HEPÁTICA	42
3.11 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	42
3.11.1 Protocolo de TBARS em amostras de plasma	42
3.11.2 Protocolo de TBARS em amostras de tecido	43
3.12 OXIDAÇÃO DE PROTEÍNA	43
3.12.1 Protocolo de AOPP em amostras de plasma	43
3.12.2 Protocolo da AOPP em amostras de tecido	44
3.13 QUANTIFICAÇÃO DO RNAm do PGC-1 α	44

3.14 AVALIAÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL	45
3.15 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICAS DIRETA	45
3.16 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
4 RESULTADOS	48
4.1 RESULTADOS SOBRE OS EFEITOS ESTIMULANTES DO OEP.....	49
4.1.1 Ingestão aguda com OEP possui efeitos estimulantes, enquanto a longo prazo ocorre prejuízo sobre a capacidade física.....	49
4.1.2 A suplementação com OEP não apresentou efeitos sobre a atividade locomotora espontânea em ratos Wistar	50
4.2 EFEITOS DO OEP SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	51
4.2.1 A suplementação com OEP não altera o comportamento de ratos Wistar.....	51
4.3 EFEITOS DO OEP SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E MASSA TECIDUAL	53
4.3.1 A suplementação com OEP não contribui com a perda de peso corporal de ratos Wistar.....	53
4.3.2 A suplementação com OEP não altera o consumo alimentar de ratos Wistar	53
4.3.3 O OEP não altera a massa tecidual do coração, músculos esqueléticos e glândulas adrenais	54
4.4 RESULTADOS SOBRE OS EFEITOS DO OEP SOBRE SEU POTENCIAL HEPATOTÓXICO	55
4.4.1 O OEP por 4 semanas não produz efeitos tóxicos ao fígado.....	55
4.5 RESULTADOS SOBRE OS EFEITOS DO OEP SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	55
4.5.1 OEP reduz os níveis de TBARS e AOPP no músculo sóleo e fígado.....	55
4.6 EFEITOS DO OEP SOBRE A BIOGÊNESE MITOCONDRIAL	56
4.6.1 Doses não recomendadas de OEP ingeridas a longo prazo reduz a expressão do RNAm do PGC-1α sem alterar o conteúdo mitocondrial no músculo sóleo	56
4.7 EFEITOS AGUDOS DO OEP SOBRE A RESPOSTAS HEMODINÂMICAS..	57

4.7.1 A suplementação aguda de doses controladas de OEP é capaz de aumentar a pressão arterial e a frequência cardíaca de ratos normotensos.....57

5 DISCUSSÃO60

6 CONCLUSÃO.....71

7 REFERÊNCIAS73

8 ANEXO I79

9 ANEXO II90

1 INTRODUÇÃO

A busca pelo corpo perfeito (estética) ou pela melhora do desempenho esportivo nem sempre tem seus limites definidos pelos critérios da fisiologia e por muitas vezes, o uso de substâncias estimulantes como: esteroides, anabolizantes, bebidas energéticas e outros suplementos alimentares são feitos de maneira indiscriminada (PIPE & AYOTTE, 2002). Nesse caminho, nem sempre os riscos são calculados ou os prejuízos para a saúde do indivíduo a longo prazo são levados em consideração. Estudos mostram que 80% dos consumidores destes suplementos não estão familiarizados com os riscos associados ao seu consumo (O'DEA, 2003; ALVES & LIMA, 2013).

Em 2011, um relatório gerado pela *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* (SAMHSA) revelou uma tendência ascendente em atendimentos de emergência envolvendo o consumo de bebidas energéticas de forma isolada (56% dos casos) ou combinados com drogas ou álcool (EUDY *et al.*, 2013). Na grande maioria, estas ocorrências resultam de ingredientes capazes de estimular o sistema nervoso central (SNC) presente em suplementos alimentares, como por exemplo o 1,3 dimetilamilamina (DMAA) e a cafeína. Estes estimulantes podem aumentar o risco de efeitos adversos no sistema cardiovascular, e quando combinados ao exercício físico podem impor um estresse adicional, aumentando o potencial para uma piora de tais efeitos (BLOOMER *et al.*, 2011; EUDY *et al.*, 2013). Mesmo assim, indivíduos de todas as idades fazem o uso de pelo menos um tipo de suplemento alimentar (MCCARTHY *et al.*, 2011).

Nos Estados Unidos da América (EUA) aproximadamente 80% dos adultos fazem o uso de um ou mais suplementos durante o ano (MCCARTHY *et al.*, 2011; GELLER *et al.*, 2015). Na Europa (Finlândia, Alemanha, Romênia, Itália, Espanha e Reino Unido) uma recente pesquisa apontou que 18,8% dos indivíduos admitiram usar um ou mais suplementos alimentares (GARCÍA-CORTÉS *et al.*, 2016). No Brasil, uma inédita pesquisa sobre o consumo de suplementos alimentares divulgada pela Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Para Fins Especiais e Congêneres (ABIAD) juntamente com Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (Abifisa) e a Associação Brasileira das Empresas de Produtos Nutricionais (Abenuutri) apontaram que 54% dos lares brasileiros afirmam ter pelo menos um indivíduo que consome algum tipo de suplemento (ABIAD, 2016). Este aumento no consumo de suplementos fez com que esse mercado se tornasse um grande negócio nos países

industrializados. Estima-se um aumento de 4.000 tipos de produtos em 1994 para mais de 55.000 em 2012. Os números de vendas destes produtos também aumentaram a partir do ano de 2004 e atingiu um valor de 61 bilhões de dólares para economia dos EUA no ano de 2008 (GELLER *et al.*, 2015).

Segundo a *Dietary Supplement Health and Education Act of 1994* (DSHEA) suplementos alimentares são considerados como ervas, produtos botânicos, complementos nutricionais (ex: aminoácidos) e micronutrientes (vitaminas e minerais) (GELLER *et al.*, 2015; GARCÍA-CORTÉS *et al.*, 2016). A regulamentação destes produtos à base de plantas ou ingredientes naturais, podem variar entre diferentes países (GARCÍA-CORTÉS *et al.*, 2016). No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação de suplementos alimentares é a agencia nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Nos EUA a agência norte-americana *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) é o principal órgão encarregado da supervisão dos suplementos alimentares, embora, nenhum teste seja exigido para determinar a segurança e aprovação destes produtos antes de serem comercializados (GELLER *et al.*, 2015). Entre diversos ingredientes encontrados em suplementos alimentares, o DMAA foi alvo de grande investigação e proibição pelas agências regulamentadoras em diversos países nos últimos anos (RODRICKS & LUMPKIN, 2013; FDA, 2013; EUDY *et al.*, 2013).

O DMAA esteve presente na formulação de diversos produtos conhecidos como pré-treinos, entre os mais famosos o Lipo-6-Black, Jack3d e OxyElite Pro (OEP). Muitos destes produtos têm sido apontados pela literatura como responsáveis a apresentar diversos efeitos nocivos à saúde, associado ao seu uso (FORRESTER, 2012; ELIASON *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2012; GEE *et al.*, 2012; FARNEY *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 2014; ARCHER *et al.*, 2015). Ao mesmo tempo, alguns estudos veem tentando estabelecer um perfil seguro para o uso do DMAA isolado ou como ingrediente em suplementos alimentares. Apesar destes estudos já terem sido realizados, a grande maioria foi desenvolvida por um único grupo de pesquisa que recebeu financiamento da USPlabs (Empresa que fabrica produtos contendo DMAA) (BLOOMER *et al.*, 2011; MCCARTHY *et al.*, 2011; MCCARTHY *et al.*, 2012; WHITEHEAD *et al.*, 2012; BLOOMER *et al.*, 2013; SCHILLING *et al.*, 2013). Até o momento, para nosso conhecimento ninguém estudou os efeitos de suplementos contendo DMAA em doses controladas em modelo animal.

1.1 1,3 DIMETILAMILAMINA (DMAA)

O DMAA foi inicialmente usado entre os anos de 1940-1970 como princípio ativo de descongestionante nasal chamado de *Forthane*® desenvolvido pelo laboratório farmacêutico Eli Lilly atuando como agente vasoconstritor na mucosa nasal (VENHUIS & KASTE, 2012; ELIASON *et al.*, 2012). O seu uso se deu até o ano 1983 quando este ingrediente foi retirado do mercado, ressurgindo anos mais tarde (2006) como um componente de diversos suplementos alimentares com a promessa de auxiliar com a perda de peso, bem como, melhorar a performance física (ARMSTRONG, 2012; FORRESTER *et al.*, 2013; DOLAN *et al.*, 2014).

Desde então o número de produtos contendo DMAA veio aumentando e se tornando os mais vendidos em lojas de nutrição convencionais sob o pretexto de ser uma substância natural (GEE *et al.*, 2102; ELIASON *et al.*, 2012; FORRESTER *et al.*, 2013; DUNN, 2016). Isso só se tornou possível devido a um pequeno artigo publicado no ano de 1996 no Jornal do Instituto de Tecnologia de *Guizhou*, onde descreveram o DMAA como um ingrediente natural extraído de gerânio (*Pelargonium graveolens*) (ZHANG *et al.*, 2012). Entretanto, em 2009 este ingrediente foi adicionado à lista de substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidoping (WADA) considerado como agente estimulante, podendo melhorar o desempenho, bem como, representar uma ameaça à saúde (ZHANG *et al.*, 2012; DUNN, 2016). Em 2011, a Associação Americana de Produtos Herbais (AHPA) declarou que os fabricantes de suplementos não deveriam rotular o DMAA como sendo de origem natural. Esta ação foi apoiada pela *United Natural Products Alliance* (UNPA) (ZHANG *et al.*, 2012).

No mesmo ano (2011) o DMAA passou a ser proibido no Canadá e desde então, diversos outros países restringiram e proibiram o seu uso (DUNN, 2016). Em fevereiro de 2012 o Departamento de Defesa do Estados Unidos removeu das lojas todos os produtos contendo DMAA. No mesmo período no Reino Unido o Agência Reguladora de Medicamentos e Produtos de Saúde advertiu várias empresas a interromper a venda destes produtos. Em março do mesmo ano o ministério da saúde de Nova Zelândia impôs a proibição por completo do DMAA no país (GEE *et al.*, 2012; FORRESTER *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2014; DUNN, 2016). Entretanto, o uso do DMAA ainda se tornou evidente por ter sido encontrado em testes toxicológicos no público em geral de Londres. Archer e colaboradores (2014)

detectaram o DMAA em 25% das amostras de urinas coletadas de banheiros portáteis nas ruas do centro de Londres (ARCHER *et al.*, 2014; ARCHER *et al.*, 2015). Finalmente, após a divergências de informações sobre a segurança de produtos contendo DMAA e diversos eventos adversos graves, bem como, o questionamento sobre sua origem, a *Food and Drug Administration* (FDA) anunciou em abril de 2013 que suplementos alimentares contendo o DMAA eram ilegais e deveriam ser retirados do mercado (FDA, 2013; KARNATOVSKAIA *et al.*, 2014).

1.1.1 Estrutura e nomenclatura do DMAA

O DMAA é uma amina alifática simples de cadeia linear e sua estrutura molecular contém dois centros quirais. Esta molécula partilha de amplas semelhanças estruturais com as anfetaminas e metanfetaminas (figura 1). Devido a esta grande semelhança, esta pequena molécula pode resultar em falso positivo para anfetaminas (VORCE *et al.*, 2011; VENHUIS & KASTE, 2012). O DMAA é um dos diversos nomes conhecidos para 4-metil-hexano-2-amina, além de serem encontrados na lista da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) como: (*Chemical Abstracts Service number*: 105-41-9), methylhexaneamine, 2-amino-4-metilhexano, 4-metil-2-hexalamina, 4-metil-2-hexanoamina 1,3-dimetilpentalamina entre outros (GEE *et al.*, 2012; ELIASON *et al.*, 2012; FLEMING *et al.*, 2012; FORRESTER *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2014). O nome geranamina refere-se ao óleo de gerânio o que é questionado como uma fonte natural de DMAA (VENHUIS & KASTE, 2012).

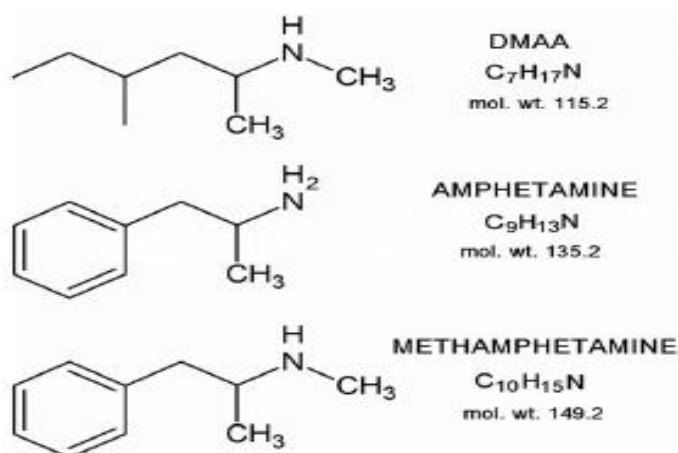


Figura 1: Estrutura química do 1,3 dimetilamilamina (DMAA) relacionadas com anfetamina e metanfetamina (adaptado de Gee *et al.*, 2012).

1.1.2 Mecanismo de ação do DMAA

Até o momento pouco é conhecido sobre o mecanismo de ação do DMAA, embora este mecanismo não esteja bem compreendido, alguns estudos em animais demonstraram que esta substância é capaz de atuar como um simpatomimético (MIYA & EDWARDS, 1953). Seus efeitos cardiovasculares podem se dar por sua ação como inibidor na recaptção de noradrenalina (NA) e/ou indiretamente como um agente liberador de NA. Este aumento na atividade de NA estimula a lipólise, aumentando assim a concentração sanguínea de ácidos graxos livres, o que fornece uma fonte adicional de energia durante o exercício (EUDY *et al.*, 2013). Ainda, o DMAA pode estimular o músculo liso e agir como um vasoconstritor (BLOOMER *et al.*, 2011; FORRESTER *et al.*, 2013). Além disso, um recente estudo demonstrou o DMAA como um forte inibidor da enzima Citocromo P450 2D6 que é responsável por 25% do metabolismo de fármacos, componentes de suplementos alimentares entre outros (LIU *et al.*, 2015). O DMAA é absorvido de forma eficiente pelo corpo quando ingerido via oral e seu metabolismo ocorre de forma relativamente lenta (4-12 horas) sendo excretado de forma ainda mais lenta através da urina (24 horas) (VENHUIS *et al.*, 2012). Com base nos dados descritos na literatura sobre o possível mecanismo de ação, montamos o seguinte esquema mostrado na figura 2.

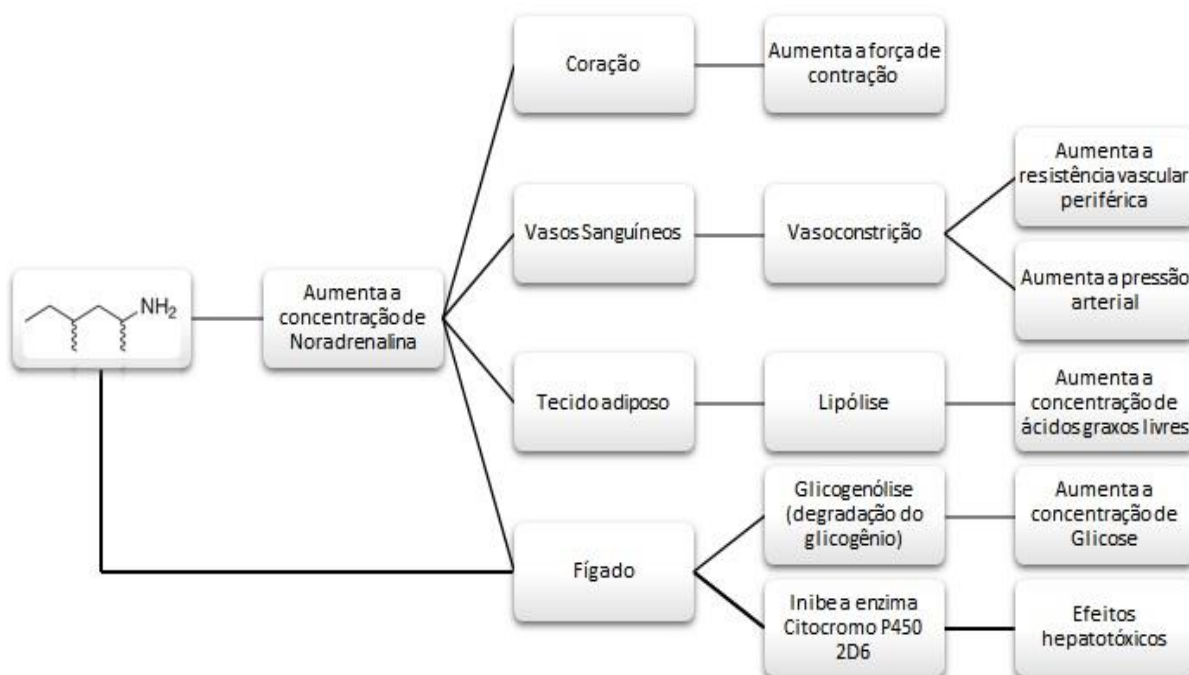


Figura 2: Mecanismo de ação do DMAA sobre os diferentes tecidos do organismo de acordo com os dados descritos na literatura.

1.1.3 O DMAA possui origem natural?

A origem natural do DMAA (plantas de gerânio ou *Pelargonium graveolens*), argumento da indústria fabricante dos suplementos, tem sido seriamente debatida na literatura. Esta discussão teve origem entre os anos de 2010-2013, quando o rótulo de diversos suplementos alimentares contendo DMAA vendido no mercado, listava este ingrediente como um extrato de planta. Consequentemente, estudos começaram a investigar folhas, caules e óleos de plantas de gerânio com o objetivo de identificar e determinar a presença deste ingrediente ser de fato de origem natural, já que esta molécula pode ser facilmente preparada sinteticamente (FLEMING *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012; VENHUIS & KASTE, 2012).

Estudos utilizando o método *high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, afirmaram contra a presença de DMAA em plantas de gerânio (FLEMING *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012). Estes resultados foram questionados já que estes estudos foram financiados pela USPlabs, empresa responsável pela produção de diversos suplementos que listava o DMAA em suas formulações. Entretanto, têm sido encontradas poucas evidências para esta sugestão, já que investigações independentes não detectaram a presença deste ingrediente em amostras de gerânio (ZHANG *et al.*, 2012; DI LORENZO *et al.*, 2012).

De fato, esta discussão não pode ser um caso de certo ou errado, já que falhas nos métodos, juntamente com as diferenças na origem das amostras de plantas de gerânio, como é o caso dos estudos citados anteriormente, processamento e composição podem explicar por que tanta controvérsia entre as investigações. Além disso, já se sabe que as variações das condições ambientais e localizações geográficas têm grande efeito sobre os perfis químicos das plantas (FLEMING *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012). Mesmo assim, vale ainda ressaltar que as concentrações de DMAA encontrados na grande maioria dos suplementos são elevadas e de modo geral as concentrações desta molécula encontrados em extratos de plantas são geralmente em pequenas proporções (ZHANG *et al.*, 2012).

1.2 PRODUTOS CONTENDO DMAA

O DMAA esteve presente na formulação de mais de 250 suplementos alimentares, com concentrações que variavam de 25-65 mg (VENHUIS & KASTE, 2012) até 285 mg por dose nos suplementos (ZHANG *et al.*, 2012). Este ingrediente

foi listado na composição de diversos produtos comercializados como por exemplo: *Forthan*, *Forthane*, *Floradrene*, *Geranamine*, *Adrena G™*, *Tiger Claw™*, *Jack3d™*, *Vyperize™*, *DStunner™*, *Razor8™*, *Methyldrene™*, *ALLMAX™*, *Freak n Muscle™*, *Methyl Fire™*, *Hemo Rage Black™*, *Muscle Warfare™*, *Napalm™*, *Nitric Blast™*, *OxyElite Pro™*, *Pressurge™*, *Unleashed™*, *Muscle Spike™*, *Cellucor M5 Extreme™*, *Body Octane GAME DAY™*, *CryoShock™*, *Flashover™*, *C4™*, *Mesomorph™*, e *PumpFixx™* (figura 3) (FORRESTER *et al.*, 2013). A venda destes produtos contendo DMAA foram responsáveis por mais de 100 milhões de dólares gastos nos Estados Unidos em 2010, sendo o Jack3d e o OxyElite Pro (OEP) os mais famosos encontrados no mercado (CARPENTER, 2012).



Figura 3: Alguns dos produtos comercializados que apresentava o ingrediente DMAA em suas formulações (fonte <http://www.fitnessboutique.com.br/blog/Fitness/suplementoalimentar/suplementoscom-dmaa/>).

1.2.1 Suplemento Oxyelite Pro (OEP)

O OEP é um conhecido suplemento produzido e comercializado pela USPlabs (figura 3). Este suplemento foi comercializado com o objetivo de auxiliar o consumidor na perda de peso, bem como melhorar a performance física durante o exercício (ROYTMAN *et al.*, 2014). A formulação antiga deste suplemento continha uma combinação de diversos ingredientes que prometia aumentar um ou mais aspectos da taxa metabólica ou lipólise. Especificamente, este produto continha uma mistura de cafeína *bauhinia purpurea*, *bacopa monniera*, extrato de caule de gerânio (1,3 dimetilamilamina), *cirsium oligophyllum* e extrato de *rauwolescine* (figura 4) (MCCARTHY *et al.*, 2012). Embora no rótulo deste suplemento não é descrito a quantidade de DMAA presente no produto, na literatura, um estudo descreveu a concentração de 31 mg de DMAA por porção (cápsula) de OEP (ZHANG *et al.*,

2012). Por fim, a presença do DMAA como ingrediente neste suplemento, começou a ser associado aos efeitos cardiovasculares e de toxicidade hepática, fazendo com que a FDA declarasse o banimento de todos produtos contendo DMAA do mercado, incluindo o OEP. Dentre um dos mais famosos encontrados no mercado, o OEP, foi reformulado em diversas versões sem a adição do DMAA onde permitiu que USPlabs retornasse com este suplemento para o mercado (ROYTMAN *et al.*, 2014; JOHNSTON *et al.*, 2016).



Figura 4: Rótulo do suplemento OxyElite Pro (fonte www.oxyelite.pro)

1.2.2 Efeitos associados ao uso do DMAA isolado ou em produtos comercializados.

Uma revisão publicada no ano de 2012, indentificou diversos estudos em animais nos anos de 1940-1950 descrevendo que o DMAA possui efeitos similares aos da efedrinas e anfetaminas dos quais incluem: aumento da pressão sanguínea arterial, vasoconstrição, taquicardia, diurese e broncodilatação (VENHUIS & KASTE, 2012). Na literatura é descrito que em camundongos a dose letal (LD₅₀) deste ingrediente é de 39 mg/kg quando injetado intravenoso e de 185 mg/kg quando injetado intraperitoneal (MIYA & EDWARDS, 1952; SCHILLING *et al.*, 2013) e em ratos a LD₅₀ é de 72,5 mg/kg quando injetado intraperitoneal (MIYA & EDWARDS, 1952; ARCHER *et al.*, 2015).

Em humanos, vários efeitos adversos foram relatados ao *Texas Poison Center Network, Dallas, TX, EUA* durante 2010-2011 associados a exposição de produtos contendo DMAA. Os efeitos descritos foram: taquicardia (28,6%), náusea

(16,1%), vômitos (12,5%), agitação/irritabilidade (8,9%), tremor (7,1%), dores abdominais (5,4%), dor torácica (5,4%), tonturas (5,4%), cefaleia (3,6%), hipertensão (3,6%), altos níveis de creatina fosfoquinase (1,8%), diaforese (1,8%), anormalidade do eletrólito (1,8%), hematêmese (1,8%), hiperventilação (1,8%), hipotensão (1,8%), midríase (1,8%), entorpecimento (1,8%), retenção urinária (1,8%) e outros/não específicos (16,1%) (FORRESTER *et al.*, 2013). Estes não são os únicos efeitos associado a tais produtos, casos mais graves e potencialmente fatais a vida dos consumidores destes suplementos foi descrita como: infarto agudo do miocárdio (SMITH *et al.*, 2014), parada cardíaca (KARNATOVSKAIA *et al.*, 2015), acidente vascular cerebral (GEE *et al.*, 2010, GEE *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2012), efeitos hepatotóxicos (FOLEY *et al.*, 2014) e morte (ELIASON *et al.*, 2012; ARCHER *et al.*, 2015). Entretanto, na grande maioria dos casos associados a estes efeitos estão relacionados ao consumo de doses altas e desconhecidas de produtos contendo DMAA ou ao uso de álcool, outros tipos de suplementos, drogas e exercício físico extenuante.

1.2.3 Estudos clínicos com DMAA isolado ou como suplemento OEP

Com intuito de estabelecer um perfil seguro em condições mais controladas, estudos clínicos foram desenvolvidos para determinar os efeitos causados pelo DMAA ou produtos contendo este ingrediente. Estes estudos foram desenvolvidos para verificar o perfil farmacocinéticos e dinâmicos para o DMAA. A questão é que a grande maioria destes estudos foram realizados com financiamento da USPlabs (BLOMMER *et al.*, 2011; MCCARTHY *et al.*, 2011; MCCARTHY *et al.*, 2012; FARNEY *et al.*, 2012; WHITEHEAD *et al.*, 2012; SCHILLING *et al.*, 2013) e em menor número por grupos de pesquisas independentes (não financiados pela USPlabs) (VAUGHAN *et al.*, 2012; DOLAN *et al.*, 2014; POWERS, 2015).

O DMAA em forma de suplemento alimentar é frequentemente ingerido combinado a cafeína, com intuito de potencializar os efeitos desta substância. Neste sentido, algumas investigações conduziram seus experimentos utilizando o DMAA isolado ou combinado a cafeína, enquanto, outros estudos avaliaram a administração de suplementos vendidos no mercado contendo DMAA. Quatro estudos estão disponíveis usando concentrações variáveis de DMAA e cafeína ingerido de forma aguda e crônica em um modelo placebo-controlado, estes estudos apresentaram efeitos notáveis sobre as respostas hemodinâmicas com aumento da

pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), duplo produto (DP) e frequência cardíaca (FC) de maneira dose dependente com a ingestão aguda destes ingredientes (BLOOMER *et al.*, 2011a; BLOOMER *et al.*, 2011b; BLOOMER *et al.*, 2013; SCHILLING *et al.*, 2013). As mudanças encontradas na pressão arterial (PA) e FC não foram explicadas pelas alterações nos níveis de norepinefrina ou epinefrina circulante (BLOOMER *et al.*, 2011a). Além disso, efeitos ergogênicos da combinação destas substâncias no desempenho de corrida em humanos não foram evidentes (BLOOMER *et al.*, 2011b).

Estudos com administração aguda e a longo prazo de suplementos contendo DMAA encontrados no mercado, como o Jack3d, (WHITEHEAD *et al.*, 2012) e o OEP (FARNEY *et al.*, 2012) foram realizados. Estes suplementos ingeridos a longo prazo não resultaram em quaisquer efeitos sobre a PA, FC e de outros marcadores de saúde avaliados. Quando ingerido ambos os suplementos OEP e Jack3d de forma aguda, apenas o OEP foi capaz de aumentar PAS, PAD e DP. Contudo, é difícil de atribuir os efeitos encontrados ao DMAA, já que, ambos os produtos contêm substâncias adicionais únicas (FARNEY *et al.*, 2012). Como o OEP era vendido com a promessa de auxiliar na perda de peso corporal estudos conduzidos com a ingestão aguda (MCCARTHY *et al.*, 2011; MCCARTHY *et al.*, 2012) e crônica (MCCARTHY *et al.*, 2012) demonstraram resultados positivos do suplemento sobre a redução do peso.

Na literatura a maioria dos estudos são desenvolvidos em humanos como descrito anteriormente, porém, apenas um estudo foi realizado em modelo animal a fim de avaliar o potencial de abuso do DMAA (DOLAN & KASTE, 2012) e um estudo em cultura celular resultando em um aumento no metabolismo, conteúdo mitocondrial e na *Peroxisoma proliferator activated receptor coativador 1 alpha* (PGC-1 α) (VAUGHAN *et al.*, 2012). Contudo, a falta de estudos mecanicistas para compreender de fato os efeitos destes produtos, bem como, o pequeno número de provas em torno do DMAA, o uso de doses descontroladas ou desconhecidas, pesquisas experimentais com falta de rigor científico, associação com outros produtos, experimentos em um ambiente não controlado e com a grande maioria dos estudos financiados pela USPlabs, levou a elaboração e o desenvolvimento deste projeto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos fisiológicos e comportamentais de doses controladas do suplemento OEP ingerida de forma aguda e crônica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os efeitos do OEP ingerido de forma aguda e crônica sobre a tolerância ao esforço físico.
- 2) Investigar os efeitos de doses controladas do OEP ingerida de forma aguda e crônica sobre parâmetros comportamentais.
- 3) Investigar os efeitos do OEP ingerida de forma aguda e crônica sobre a peso corporal, consumo de ração e água.
- 4) Investigar os efeitos do OEP ingerido de forma crônica sobre a toxicidade hepática.
- 5) Avaliar os efeitos do OEP ingerido de forma crônica sobre a massa tecidual.
- 6) Avaliar os efeitos do OEP ingerido de forma crônica sobre o estresse oxidativo circulante e tecidual.
- 7) Investigar os efeitos do OEP ingerido de forma crônica sobre a biogênese mitocondrial muscular esquelética.
- 8) Investigar os efeitos do OEP ingerido de forma aguda sobre respostas hemodinâmicas cardiovasculares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os protocolos experimentais foram aprovados e autorizados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob o protocolo nº 007/2015. Todos os procedimentos experimentais estão em conformidade com os princípios internacionais para pesquisa envolvendo animais (Genebra), e com a legislação brasileira disposta na Lei nº 11.794/2008.

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, entre seis e dez semanas de idade. Os ratos foram fornecidos pelo biotério central do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Todos os animais foram mantidos em condições adequadas com temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas com livre acesso a água e ração, com ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Os animais foram mantidos em caixas coletivas com no máximo cinco animais em cada caixa.

Inicialmente os ratos foram suplementados com doses controladas do suplemento OEP de forma a ingerir uma única dose (aguda) para avaliar os efeitos agudos sobre performance física, atividade locomotora espontânea, parâmetros comportamentais, consumo alimentar e respostas hemodinâmicas. Após os testes com a suplementação aguda, os animais foram suplementados diariamente por um período de 4 semanas (crônico). Ao final do período de suplementação crônica, foram avaliados novamente o efeito sobre a performance física, atividade locomotora espontânea, parâmetros comportamentais, consumo alimentar, além disso, foram avaliados massa tecidual, toxicidade hepática, estresse oxidativo e biogênese mitocondrial. Apenas o protocolo de medidas hemodinâmicas não foi realizado após a suplementação crônica. Em ambos os protocolos (agudo e crônico) os testes foram realizados 30 minutos após a ingestão do OEP, com exceção para o segundo teste de tolerância ao exercício que foi realizado 48 horas após o último dia de suplementação. O grupo 4,3 mg/kg de OEP foi excluído do protocolo crônico por não apresentar efeitos no teste de tolerância ao exercício desenvolvido após a ingestão aguda. Um esquema do desenho experimental realizado no presente estudo pode ser observado na figura 5.

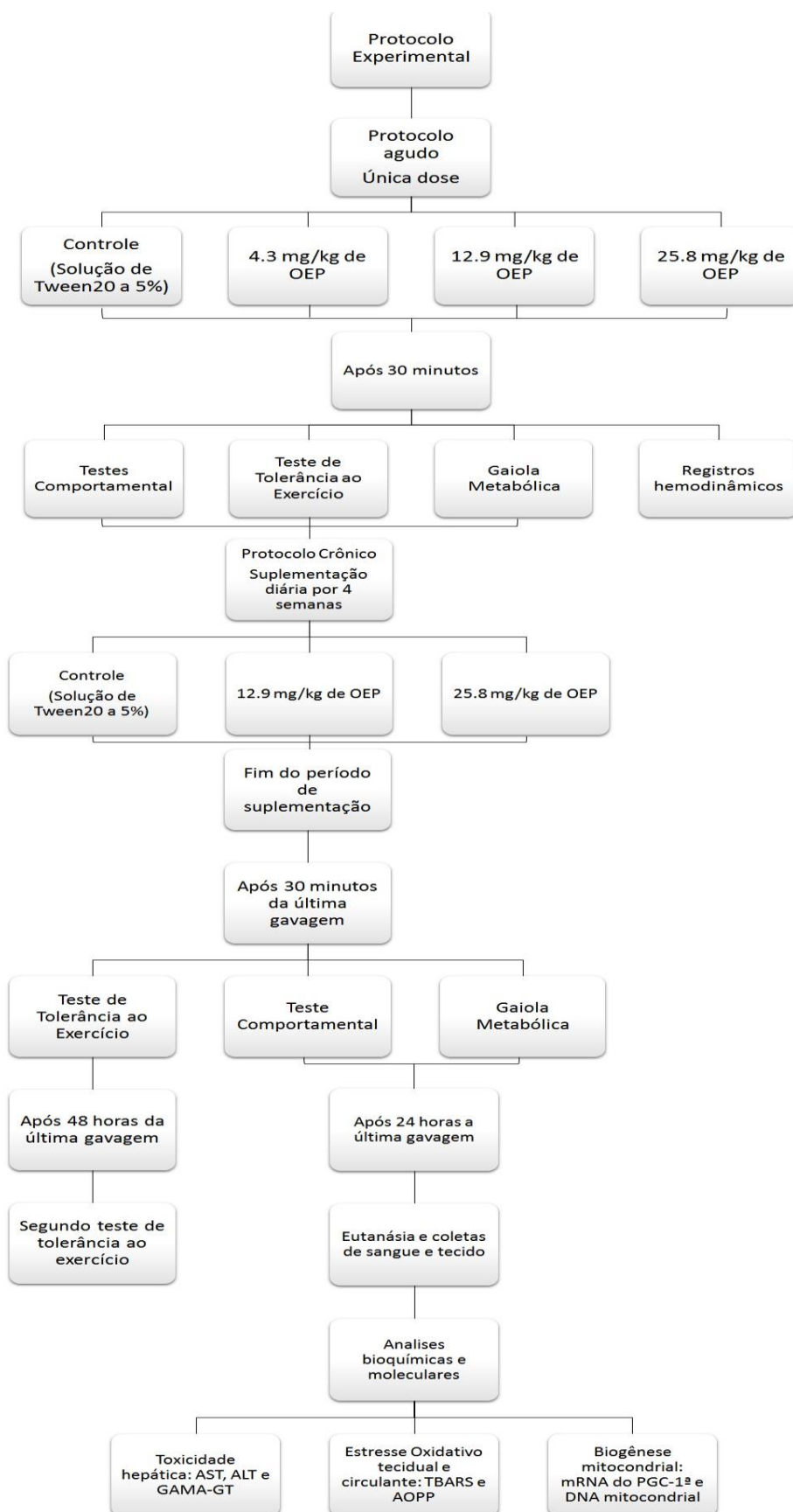


Figura 5 – Esquema representativo do desenho experimental desenvolvido durante o projeto.

3.3 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DO SUPLEMENTO

As cápsulas do suplemento OxyElite Pro (OEP) foram abertas, pesadas e diluídas em solução de Tween20 a 5% com auxílio de vortex por três minutos. Uma solução estoque do OEP foi preparada na concentração de 24 mg de OEP para cada 1 ml de solução de Tween20 a 5%. As doses para cada animal foram calculadas com base no peso corporal e preparada em um volume padrão de 400 µl. Para a ingestão aguda (dose única) as doses de OEP foram preparados e administrados 30 minutos antes dos testes. Para a ingestão crônica (4 semanas de suplementação) os suplementos eram preparados por um período de 3 dias de suplementação. A administração foi realizada por gavagem via oral e todos os experimentos foram realizados no desenho cego, onde quem realizava o protocolo experimental não sabia o que cada animal havia ingerido. Os pesos dos animais foram avaliados semanalmente, ao longo das 4 semanas de suplementação para avaliação da perda de peso corporal.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram determinados de acordo as doses recomendadas no rótulo do produto pelo fabricante (uma cápsula de OEP para 70 quilogramas de peso corporal de um adulto). Os animais foram separados randomicamente em 4 grupos experimentais: grupo controle (Tween20 a 5%), 4,3 mg/kg de OEP (equivalente a uma capsula, dose mínima recomendada por dia), 12,9 mg/kg de OEP (equivalente a três cápsulas, dose máxima recomendada por dia) e 25,8 mg/kg de OEP (equivalente a seis cápsulas, dose não recomendada). As doses excessivas (não recomendadas) foram utilizados para avaliar os efeitos indesejados que poderiam ser causados pelo suplemento.

3.5 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Para análise comportamental foi utilizado o teste do Labirinto em cruz elevado (LCE), primeiramente a sala foi preparada nas condições adequadas para a execução do teste. Uma luz vermelha foi colocada para manter o ambiente confortável para os animais e uma câmera de vídeo digital foi posicionada a cima do aparato e acoplada a um computador para registro. O labirinto foi montado no centro da sala posicionado em baixo da câmera elevado a 60 cm do solo. O labirinto em

cruz elevado consiste em um aparato com dois braços abertos (sem paredes) e dois braços fechados (com paredes), com os braços de tamanhos iguais cruzados em ângulo reto conectados por uma área central. Os animais receberam a suplementação via gavagem e 30 minutos após a ingestão foram colocados na área central do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços abertos, durante 5 minutos os animais poderiam andar livremente tanto entre os braços abertos quanto nos braços fechados. Durante a execução do teste não havia barulhos ou ruídos dentro da sala. O número de entradas em ambos os braços, assim como o tempo gastos em cada braço do LCE foram avaliados. Entre cada sessão de teste todo o aparato era limpo com álcool 70%. Os vídeos foram analisados utilizando o software *AnyMaze*.

3.6 OPEN FIELD

Imediatamente após a exposição do protocolo de labirinto em cruz elevada foram realizados o teste Open Field (campo aberto) utilizado para avaliação de atividade locomotora espontânea. O aparato consiste em uma caixa quadrada preta de acrílico medindo 43,2 cm x 43,2 cm fechado por paredes de 30,5 cm de altura posicionado no meio da sala. Uma câmera de vídeo digital foi posicionada em cima do aparato e acoplada ao computador para registro. Rapidamente após passar pelo LCE o animal era posicionado no centro da arena onde poderia se movimentar livremente por um período de 5 minutos. Os parâmetros determinados para avaliação da atividade locomotora espontânea foram: os números de cruzamento de um lado para o outro da caixa, distância total percorrida e tempo móvel. Entre cada sessão de teste todo o aparato era limpo com álcool 70%. As análises foram realizados pelo software *AnyMaze*.

3.7 TESTE DE TOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO (TTE)

Para avaliação de performance física foi utilizado o protocolo de teste de tolerância ao exercício (TTE). O teste foi realizado tanto com a ingestão aguda quanto após 4 semanas de suplementação (crônico). Com a ingestão aguda foi realizado apenas um TTE e após o período de suplementação crônica dois TTE foram realizados: um teste realizado 30 minutos após a última gavagem e um segundo teste 48 horas após ao término da suplementação. O teste de esforço

máximo constituiu em um teste escalonado em esteira motorizada para ratos com 6 baias individuais com altura 180 mm, largura interna 97 mm, comprimento de 385 mm (Sciencelabor, modelo SLP 033^a) por um período total de cinco dias (figura 6).



Figura 6 – Foto representativa da esteira e do teste de tolerância ao exercício realizado neste projeto. Este protocolo foi desenvolvido em três momentos, após 30 minutos a ingestão de uma única dose; 30 minutos após a última dose ao final do período de suplementação por 4 semanas (crônico); e 48 horas após a ingestão da última dose ao final do período de suplementação por 4 semanas.

A adaptação foi realizada nos três primeiros dias consecutivos. Os animais foram colocados em baias individuais e adaptados por um período de 10 minutos com velocidade incremental, iniciando com velocidade de 7 metros/minutos até o tempo de 4 minutos, aumentando a velocidade para 9 metros/minutos até o tempo de 7 minutos e finalmente com velocidade de 13 metros/minutos até o tempo de 10 minutos. Após o período de adaptação os animais ficaram em repouso por um dia (4^o dia) e no dia seguinte ao repouso os animais foram submetidos ao teste de esforço máximo (5^o dia). O teste iniciou com velocidade de 7m/min com incremento a cada 3 minutos, até que fosse atingida a velocidade máxima suportada pelos animais, ou seja, a exaustão. A exaustão foi estimada pela incapacidade de locomoção do animal durante o teste e as variáveis analisadas foram o tempo total e a distância em metros percorrido por cada animal durante o teste de esforço ao exercício. A tabela 1 mostra a velocidade utilizado em cada tempo durante o teste.

Tabela 1 – Velocidade percorrida por cada animal de acordo com o tempo durante o período do teste.

Tempo (Minutos)	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30	30-33	33-36
Velocidade (Metros/Minutos)	7	9	13	15	18	20	22	24	27	30	33	36

3.8 GAIOLA METABÓLICA

O teste de gaiola metabólica (figura 7) foi utilizado para avaliar o consumo de ração e água de cada animal por um período de 24 horas. Os animais de cada grupo foram colocados em gaiolas metabólicas individuais (TECNIPLAST, ITALIA) e o consumo de ração e água foram quantificados. O teste tem um período de duração de 2 dias. No primeiro dia os animais foram adaptados por um período de 24 horas antes do teste com uma dieta padrão com água e ração à vontade. Após o período de adaptação os animais receberam um volume de água padrão de 250 ml e uma quantidade de ração de 40g e permaneceram por mais um período de teste por 24 horas (2º dia). Após o período de teste a água e ração foram pesados e medidos e a diferença foi calculado para determinar o consumo alimentar de cada animal.

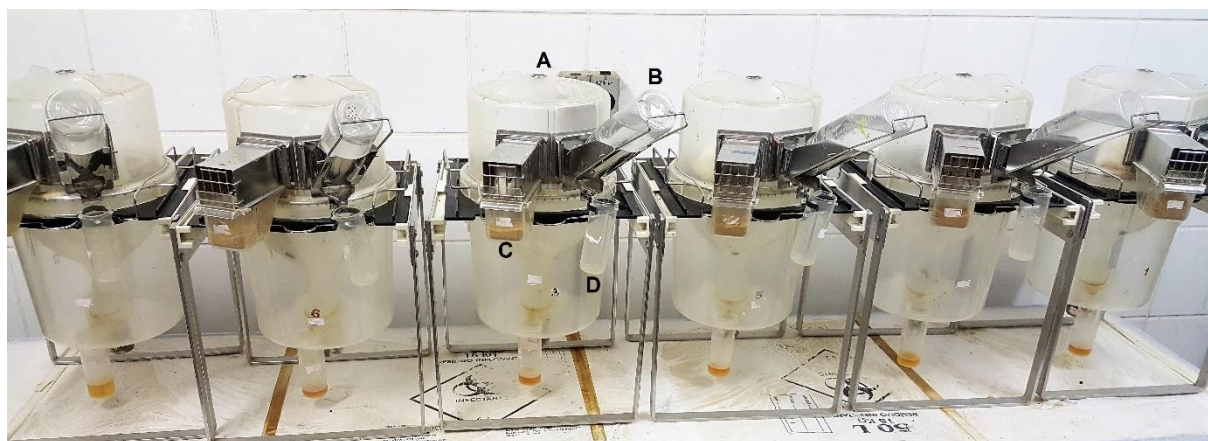


Figura 7 – Gaiolas metabólicas individuais utilizadas para o teste de consumo alimentar: A) local onde o animal é mantido durante o período de teste; B) bebedouro com volume de 250 ml; C) pote de armazenamento de ração com 40g acoplado a repartição de desperdício; e D) pote onde é armazenado o desperdício de água.

3.9 SACRIFÍCIO E COLETA DE TECIDOS

Ao final do período experimental, os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal da combinação de 100 mg/kg de ketamina e 10 mg/kg de xylazina, para a retirada do sangue e eutanasiados com uma injeção intravenosa de ketamina. As amostras de sangue foram retiradas através da veia submandibular com seringa contendo heparina. As amostras de sangue foram centrifugadas a temperatura de 4°C a 3.500 rpm com duração de 10 minutos. O plasma foi coletado e armazenados no -80°C para futuras análises.

Após a coleta de sangue os animais foram eutanasiados e imediatamente as amostras de tecidos foram retiradas cirurgicamente: coração, glândulas adrenais, músculo esquelético (sóleo, gastrocnêmios ambas as porções) e uma porção do fígado. Os tecidos foram pesados, lavados em solução de tampão fosfato salino (PBS) e armazenados a -80°C para futuras análises.

3.10 TOXICIDADE HEPÁTICA

A atividade das enzimas Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) e γ -Glutaminotransferase (GAMA-GT) foram medidas no plasma, usando kits comerciais Bioclin de acordo com as instruções do fabricante. Uma curva padrão foi construída usando solução estoque dos substratos das transaminases para quantificação. Todas as amostras de transaminases foram lidas no comprimento de onda de 505 nm e GAMA-GT a 405 nm.

3.11 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

3.11.1 Protocolo de TBARS em amostras de plasma

Os níveis de peroxidação lipídica foram determinadas usando o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Ensaio espectrofotométrico baseado na reação entre Malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) (Leal *et al.*, 2015). Foram colocadas em um eppendorf 75 μ l de água destilada, 50 μ l de plasma, 125 μ l de ácido tricloroacético 17,5% e 125 μ l ácido tiobarbitúrico 0,6% e rapidamente misturados em um vortex. Em seguida as amostras foram colocadas em banho seco a 100°C durante o período de 20 minutos. Após ser retirado do banho seco, as amostras foram esfriadas em gelo e em seguida acrescentados 125 μ l de ácido tricloroacético 70% e novamente misturado em vortex. As amostras foram incubadas em caixa tampada contendo gelo por 20 minutos. Após o período

de incubação as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos a temperatura de 4°C. Ao final do processo de centrifugação 100 µl do sobrenadante foram coletados e colocados em triplicata em placa de Elisa e lida em comprimento de onda a 532 nm usando espectrofotômetro. Para o cálculo da concentração de MDA de cada amostra utilizou-se a seguinte fórmula: Concentração de MDA (nmol) = [Absorbância a 532 nm/ (coeficiente de extinção molar do MDA x caminho óptico)] x diluição. Os valores foram corrigidos pela dosagem de proteína feitos nas mesmas amostras pelo método de Bradford.

3.11.2 Protocolo de TBARS em amostras de tecido

Para realizar o protocolo de peroxidação lipídica nos tecidos (músculo sóleo e gastrocnêmio porção vermelha e branca, fígado e coração) foram colocadas 100 mg de amostra de cada tecido avaliado em um eppendorf e homogeneizada em 500 µL de solução de ácido tricloroacético 15% misturado ao hidroxitolueno butilado 45 mM. Após o processo de homogeneização as amostras foram levadas ao banho seco com temperatura de 100°C por um período de 15 minutos. Assim que foram retiradas do banho seco as amostras foram rapidamente centrifugadas a uma velocidade de 14.000 rpm por um período de 2 minutos a temperatura de 4°C. Ao término do processo de centrifugação 300 µL do sobrenadante foram coletados e misturado com 300 µL de Ácido tiobarbitúrico 0,73% com as amostras ainda quente. Rapidamente as amostras foram levadas novamente ao banho seco a 100°C por um período de 30 minutos. Em seguida ao término dos 30 minutos foram pipetadas 200 µL do sobrenadante de cada amostra em triplicata em placa de Elisa e lida em comprimento de onda a 532 nm usando espectrofotômetro. Para o cálculo da concentração de MDA em cada amostra utilizou-se a seguinte fórmula: Concentração de MDA (nmol) = [Absorbância a 532 nm/ (coeficiente de extinção molar do MDA x caminho óptico)] x diluição. Os valores foram corrigidos pela dosagem de proteína feitos nas mesmas amostras pelo método de Bradford.

3.12 OXIDAÇÃO DE PROTEÍNA

3.12.1 Protocolo de AOPP em amostras de plasma

Um outro marcador para o estresse oxidativo, chamado de produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP) foi utilizado. Os níveis dos produtos de

oxidação proteica presente no plasma foram quantificados pipetando diretamente na placa de Elisa 160 μL de PBS seguidos de 10 μL de iodeto de potássio (KI) e 40 μL da amostra do plasma. Após o termino da primeira etapa do protocolo foram adicionados 20 μL de ácido acético glacial (ultrapuro) e em seguida a placa foi submetida ao *shaker* para agitação com velocidade de 90 rpm durante um tempo de 6 minutos. Imediatamente ao processo de agitação a leitura da placa foi realizado com o comprimento de onda de 340 nm. A curva padrão para quantificar os níveis de AOPP foi feita com o uso de cloramina-T (0 a 100 μM). Todas as amostras foram feitas em triplicata e o resultado final foi expresso em $\mu\text{mol/L}$. Os valores foram corrigidos pela dosagem de proteína feitos nas mesmas amostras pelo método de Bradford.

3.12.2 Protocolo da AOPP em amostras de tecido

Os níveis de AOPP nos tecidos (músculo sóleo e gastrocnêmio porção vermelha e branca, fígado e coração) foram determinados de acordo com o seguinte protocolo, foram colocados 200 mg de amostra de tecido em um eppendorf para homogeneização com 1,0 mL de água destilada. Após este processo as amostras foram centrifugadas a temperatura de 4°C com velocidade de 3.500 rpm em um tempo de 10 minutos. Foram pipetados diretamente na placa de Elisa 40 μL do sobrenadante e acrescentado 160 μL de PBS, 10 μL de KI e 20 μL de ácido acético glacial (ultrapuro), submetidos ao *shaker* para agitação com velocidade de 90 rpm durante 6 minutos. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 340 nm. Imediatamente ao processo de agitação a leitura da placa foi realizado com o comprimento de onda de 340 nm. A curva padrão para quantificar os níveis de AOPP foi feita com o uso de cloramina-T (0 a 100 μM). Todas as amostras foram feitas em triplicata e o resultado final foi expresso em $\mu\text{mol/L}$. Os valores foram corrigidos pela dosagem de proteína feitos nas mesmas amostras pelo método de Bradford.

3.13 QUANTIFICAÇÃO DO RNAm do PGC-1 α

Para a análise da expressão relativa do gene do *peroxissoma proliferator activated receptor coativador 1 alpha* (PGC-1 α), foi utilizado o método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). As amostras dos músculos

esqueléticos foram homogeneizadas em Trizol e o RNA total foi isolado de acordo com as instruções do fabricante (*Invitrogen Life Technologies, Strathclyde, UK*). A concentração total do RNA e sua integridade foram avaliadas, e posteriormente foi realizado o RT-PCR. A expressão do RNAm foi avaliada por oligonucleótidos iniciadores como se segue: PGC-1 α , 5'-ACC AAA CCC ACAGAGAACAG-3' e 5'-GGGTCAGAGGAAGAGATAAAGTTG-3'. A expressão de Ciclofilina A, 5'-AATGCTGGACCAAACACAAA-3' e 5'-CCTTCTTTACCTTCCCAA-3', foi utilizada como controle interno do erro experimental da RT-PCR. A quantificação da expressão de gene alvo foi realizada com o kit *SYBRgreen PCR Master Mix (Applied Biosystem, CA, EUA)*. A expressão relativa do RNAm foi realizada por PCR em tempo real utilizando o Sistema de Dectecção de Sequência ABI PRISM 7700 (*Aplicado Biosystem*).

3.14 AVALIAÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL

A relação DNA mitocondrial e nuclear foi utilizada para estimar o número de cópia mitocondrial no tecido muscular esquelético. O DNA do músculo esquelético foi extraído usando Trizol seguindo as instruções dos fabricantes (*Invitrogen Life Technologies, Strathclyde, UK*). O DNA template, também chamado de fita molde, foi amplificado por PCR em tempo real para determinar a quantidade relativa de DNA mitocondrial e nuclear usando o kit *SYBRgreen PCR Master Mix (Applied Biosystem, CA, USA)*. Os seguintes *primers* para o gene ND1 (subunidade 1 da NADH desidrogenase) 5'-TCGGAGCCCTACGAGCCGTT-3' e 5'-AGGGAGCTCGATTTGTTTCTG-3' e para o gene do RNA 18S codificado pelo núcleo, 5'-TAGTTGCATCTTGGGAGCGGG-3' e 5'-CCGCGGTCCTATTCCATTATT-3 foram usados. As expressões de DNA's mitocondrial e nuclear foram realizadas por meio do PCR tempo real utilizando o Sistema de Dectecção de Sequência ABI PRISM 7700 (*Aplicado Biosystem*).

3.15 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICAS DIRETA

Para a medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), os animais foram pesados e anestesiados com ketamina 90 mg/kg e Xylazina 10 mg/kg através de injeção intraperitoneal, e submetidos à cirurgia para cateterização da artéria femoral direita. Após a anestesia os animais eram fixados em uma mesa

cirúrgica adequada para ratos, feita com uma superfície plana na posição de supino. A pele entre a pata esquerda e o abdômen, onde foi feita a incisão cirúrgica foi cuidadosamente limpa para a introdução do cateter na artéria. Após a identificação da arterial femoral, ela foi cuidadosamente separada e cateterizada usando uma cânula de polietileno PE-50 acoplada na ponta uma cânula de polietileno PE-10 preenchida com solução de heparina (50 UI/mL), para evitar a formação de coágulos, e ocluídas com um pino de metal. O cateter foi transpassado com auxílio de um trocáter pelo tecido subcutâneo ao longo do dorso até próximo a região do pescoço, no qual, ficou exteriorizado. A extremidade do cateter foi fixada à pele para avaliação das medias hemodinâmicas.

As medidas hemodinâmicas foram realizadas 24 horas após o procedimento cirúrgico com o animal consciente. Para medidas hemodinâmicas a cânula foi lavada com solução de heparina para evitar possíveis interferências durante o registro, em seguida os animais foram mantidos com a cânula acoplada ao transdutor de pressão conectado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems Santa Barbara, CA, USA) por quinze minutos para a estabilizar o sinal, após este tempo o suplemento foi administrado via gavagem e os parâmetros hemodinâmicos foram registrados por mais uma hora e trinta minutos em um ambiente isento de barulhos e ruídos (figura 8). As variáveis hemodinâmicas pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram avaliados pelo *software LabChart*.



Figura 8 – Registro de um animal consciente realizado no presente estudo para avaliação dos efeitos da suplementação com OEP sobre as respostas hemodinâmicas. Este protocolo foi desenvolvido apenas com uma única ingestão do suplemento.

3.16 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados serão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados obtidos no TTE, Open Field, LCE e peso corporal foram avaliados usando a análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas. Quando ANOVA resultou em diferença significativa, esta análise foi seguida pelo teste *post-hoc Bonferroni*. Ingestão de ração e água, AST, ALT e GAMA-GT e estresse oxidativo foi usado análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando ANOVA resultou em diferença significativa, esta análise foi seguida pelo teste *post-hoc Bonferroni*. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativo. Software de estatística Prism 6.0 (Graphpad, Inc., San Diego, CA, EUA) foi usado para todas análises.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS SOBRE OS EFEITOS ESTIMULANTES DO OEP

4.1.1 Ingestão aguda com OEP possui efeito estimulante, enquanto a longo prazo ocorre prejuízo sobre a capacidade física.

O teste de tolerância ao exercício (TTE), mostrado na figura 9, avaliou os efeitos da suplementação aguda e crônica de doses controladas de OEP sobre a capacidade de exercitar. A figura 9A mostra a distância percorrida durante o teste e a figura 9B mostra a duração do teste. O efeito da administração aguda de 12,9 e 25,8 mg/kg de OEP foi capaz de aumentar a distância percorrida (Controle, 118 ± 16 metros; 4,3 mg/kg de OEP, 159 ± 37 metros; 12,9 mg/kg de OEP, 313 ± 42 metros; 25,8 mg/kg de OEP, 334 ± 48 metros, $p < 0,01$) e a duração do teste (Controle, $10,7 \pm 0,9$ minutos; 4,3 mg/kg de OEP, $13,9 \pm 1,9$ minutos; 12,9 mg/kg de OEP, $20,5 \pm 1,7$ minutos; 25,8 mg/kg de OEP, $21,1 \pm 2,3$ minutos, $p < 0,01$) quando comparados ao grupo 4,3 mg/kg de OEP e ao grupo controle. Foi observado um efeito estimulante sobre o desempenho durante o exercício com as doses 12,9 e 25,8 mg/kg de OEP ingeridas de forma aguda. Como o grupo suplementado com 4,3 mg/kg de OEP não apresentou nenhuma diferença sobre o desempenho físico, ele foi excluído dos próximos protocolos experimentais.

Os efeitos da suplementação diária por 4 semanas com OEP sobre o TTE também estão representadas nas figuras 9A e 9B. No protocolo de suplementação crônica, o TTE foi realizado em dois momentos distintos. O primeiro teste foi realizado no final do período de 4 semanas de suplementação diária após 30 minutos a última gavagem. Neste primeiro teste o objetivo foi verificar o efeito agudo após um longo período de suplementação diária com OEP. O segundo teste foi desenvolvido após 48 horas a última gavagem no final do período de suplementação crônica, com objetivo de retirar o efeito agudo da última administração. Conforme observado na figura 9, a suplementação diária por 4 semanas, resultou em um prejuízo na performance física dos grupos suplementados com 12,9 e 25,8 mg/kg de OEP comparados ao grupo controle. A figura 9A representa a distância percorrida após 30 minutos (Controle, 228 ± 66 metros; 12,9 mg/kg de OEP, 79 ± 6 metros; 25,8 mg/kg de OEP, 65 ± 4 metros, $p < 0,01$) e 48 horas (Controle, 194 ± 62 metros; 12,9 mg/kg de OEP, $60 \pm 4,6$ metros; 25,8 mg/kg de OEP, 56 ± 4 metros, $p < 0,01$) a última gavagem e na figura 9B representa a duração do teste após 30 minutos (Controle, $16 \pm 3,2$ minutos; 12,9 mg/kg de OEP, $8,3 \pm 0,5$ minutos; 25,8 mg/kg de OEP, $7,4 \pm 0,3$

minutos, $p < 0,01$) e 48 horas (Controle, 14 ± 3 minutos; 12,9 mg/kg de OEP, $6,8 \pm 0,4$ minutos; 25,8 mg/kg de OEP, $6,6 \pm 0,3$ minutos, $p < 0,01$) a última gavagem realizada no protocolo crônico de suplementação.

Entretanto, estes dados sugerem que o OEP é capaz de produzir um efeito positivo sobre o desempenho físico quando ingerido de forma aguda nas doses máxima recomendada (12,9 mg/kg de OEP) e não recomendadas (25,8 mg/kg de OEP), bem como, efeitos negativos sobre o desempenho físico para as doses utilizadas (12,9 mg/kg de OEP e 25,8 mg/kg de OEP) em ambos os TTE após a ingestão diária por 4 semanas com OEP.

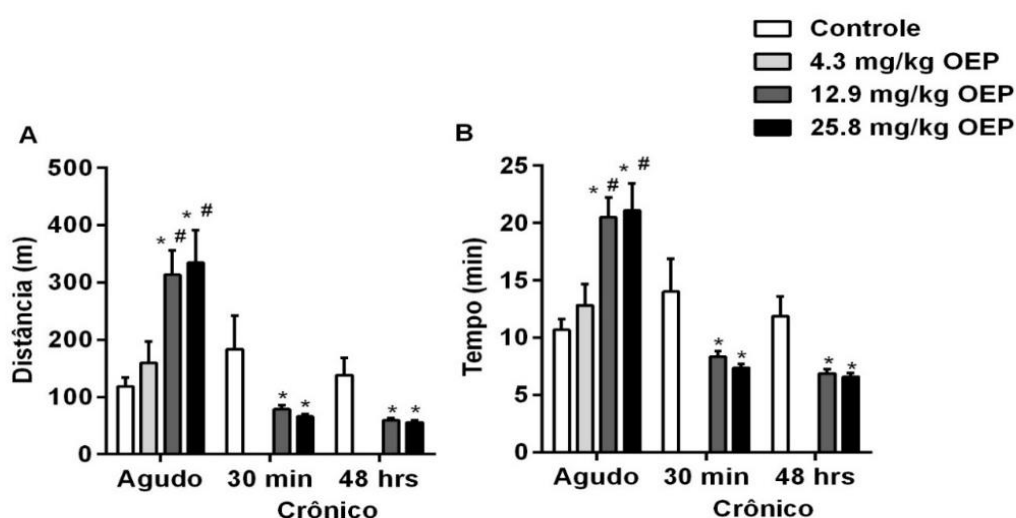


Figura 9: Efeito da suplementação com OEP sobre a capacidade de exercício.

A) Distância total, B) Tempo total. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA duas-vias e pós teste Bonferroni. * $p < 0,05$ vs grupo controle e # $p < 0,05$ vs 4.3 mg/kg OEP. OEP, OxyElite Pro. Agudo, uma única administração de OEP; Crônico, 4 semanas de administração diária de OEP; 30 min, após 30 minutos a última gavagem da suplementação crônica; 48 hrs, após 48 horas a última gavagem da suplementação crônica.

4.1.2 A suplementação com OEP não apresenta efeitos sobre a atividade locomotora espontânea em ratos Wistar

Os resultados do teste de locomoção são mostrados na figura 10, este protocolo permite avaliar a atividade locomotora espontânea dos ratos submetidos ao teste de campo aberto. Embora fosse esperado que os animais suplementados com ambas as doses (12,9 e 25,8 mg/kg de OEP) de forma aguda e crônica respondessem de maneira semelhante ao TTE, ou seja, com a ingestão aguda apresentasse um aumento na atividade locomotora espontânea, bem como, após a suplementação diária por 4 semanas com OEP diminuísse a locomoção dos animais

suplementados, estes efeitos não foram observados no teste de campo aberto. Em ambos os protocolos (agudo e crônico) nenhuma diferença foi observada entre os grupos em quaisquer dos parâmetros analisados: distância total percorrida (figura 10A), tempo móvel (figura 10B) e número de cruzamentos (figura 10C). Embora, nenhuma diferença estatística tenha sido observado nos grupos suplementados comparado ao grupo controle, houve uma clara tendência para um aumento da atividade locomotora espontânea após a suplementação aguda com 12,9 mg/kg de OEP, enquanto, ao final de 4 semanas diária de suplementação uma tendência para redução da locomoção foi observada no grupo que ingeriu doses não recomendadas de OEP (25,8 mg/kg de OEP).

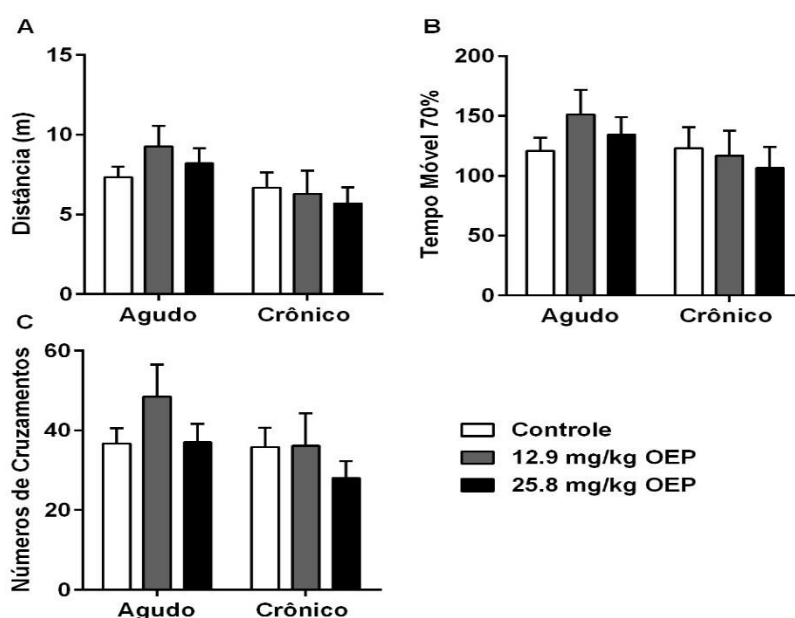


Figura 10: Efeito da suplementação com OEP sobre a atividade locomotora espontânea. A) Distância total, B) Tempo Móvel 70%, C) Números de Cruzamentos. Dados expressos como média ± EPM. ANOVA duas-vias. OEP, OxyElite Pro. Agudo, uma única administração de OEP; Crônico, 4 semanas de administração diária de OEP.

4.2 EFEITOS DO OEP SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

4.2.1 A suplementação com OEP não altera o comportamento de ratos Wistar

O teste de labirinto em cruz elevado (LCE) é considerado um confiável protocolo para análise de ansiedade em ratos, já que, simula uma situação próxima à encontrado no ambiente natural destes animais. Este protocolo não requer

aprendizagem ou condições prévias para execução do teste. No geral os animais demonstram preferência aos braços fechados (efeito ansiogênico, ou seja, produz ansiedade) e aversão natural produzida pelos braços abertos (efeito ansiolítico, ou seja, diminui a ansiedade). A suplementação aguda e crônica com ambas as doses de OEP (12,9 e 25,8 mg/kg de OEP) não resultaram em nenhuma diferença em quaisquer variáveis analisadas: número de entradas nos braços abertos (figura 11A), número de entradas nos braços fechados (figura 11B), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (figura 11C) e porcentagem de tempo gasto nos braços fechados (figura 11D) quando comparados ao grupo controle. Portanto, de acordo com os resultados encontrados, sugerimos que, a suplementação com OEP não parecem potencializar quaisquer efeitos sobre o estado de ansiedade do animal a ponto de alterar seu comportamento durante o teste do LCE.

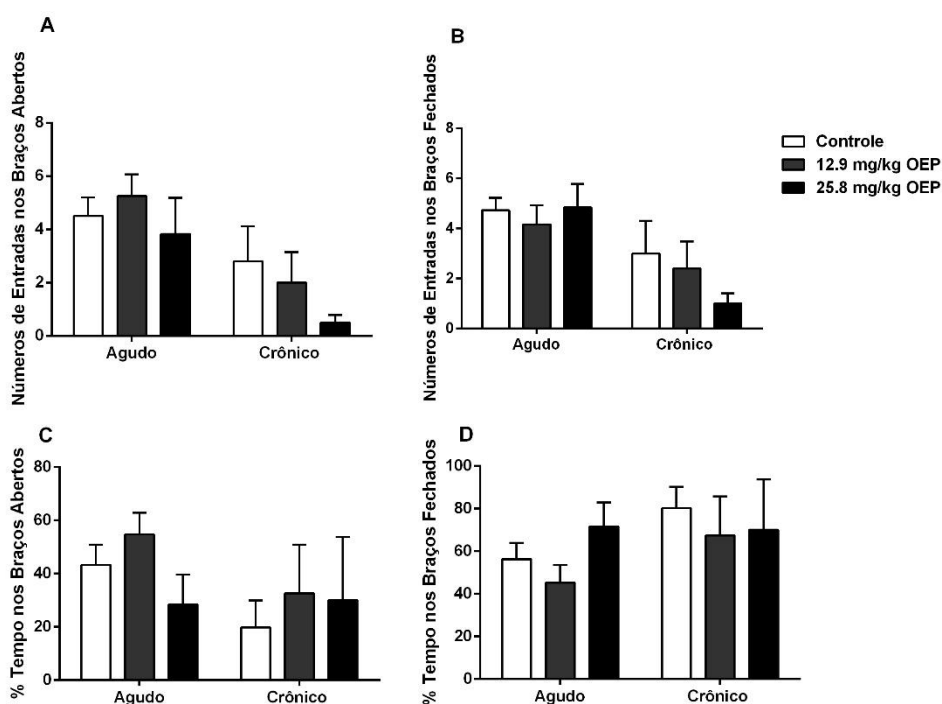


Figura 11: Efeito da suplementação com OEP sobre parâmetros comportamentais. A) Número de entradas nos braços abertos, B) Número de entradas nos braços fechados, C) % de tempo gasto nos braços abertos, D) % de tempo gasto nos braços fechados. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA duas-vias. OEP, OxyElite Pro. Agudo, uma única administração de OEP; Crônico, 4 semanas de administração diária de OEP.

4.3 EFEITOS DO OEP SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E MASSA TECIDUAL

4.3.1 A suplementação com OEP não contribui com a perda de peso corporal de ratos Wistar

O OEP é conhecido como um suplemento alimentar capaz de auxiliar na perda de peso corporal. Para avaliar tais efeitos, o peso corporal dos animais foi acompanhado durante todo o período de 4 semanas de suplementação. Não houve diferença no peso corporal entre os grupos, tanto no início (Controle, 177 ± 9 gramas; 12,9 mg/kg de OEP, 176 ± 9 gramas; 25,8 mg/kg de OEP, 163 ± 9 gramas) quanto no final do protocolo de suplementação crônica (Controle, 318 ± 9 gramas; 12,9 mg/kg de OEP, 314 ± 9 gramas; 25,8 mg/kg de OEP, 298 ± 8 gramas) como mostrado na figura 12. Estes dados demonstram que a suplementação com as doses estabelecidas neste estudo, bem como, o tempo de administração imposto aos animais, não resultaram em nenhum efeito sobre o ganho de peso corporal de ratos Wistar machos que não apresentavam sobrepeso ou obesidade.

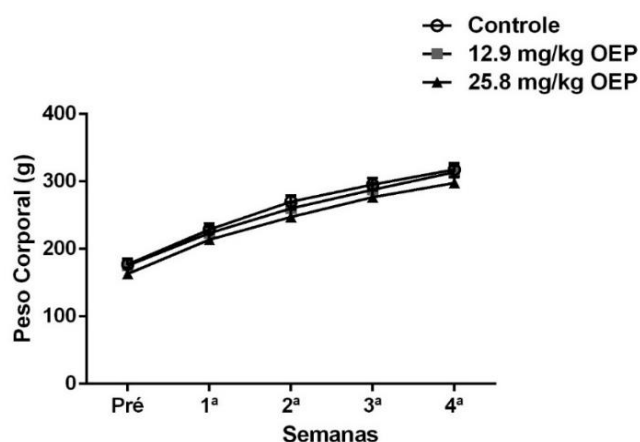


Figura 12: Efeito da suplementação com OEP sobre o ganho de peso corporal. Comparação do peso corporal (em gramas, g) entre os grupos controle e suplementados com OEP, a cada semana de suplementação diária durante 4 semanas. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA duas-vias. OEP, OxyElite Pro.

4.3.2 A suplementação com OEP não altera o consumo alimentar de ratos Wistar

Como apresentado no dado anterior, não foram encontrados resultados que comprovem o efeito do OEP sobre a redução do peso corporal. De acordo, nenhuma diferença no consumo de ração (figura 13A) e água (figura 13B), medidos em gaiolas metabólicas, foram observados entre os grupos, tanto com a administração aguda

quanto após o período de administração crônica com OEP. Portanto, de modo geral, não encontramos evidências que a ingestão aguda e após 4 semanas de suplementação diária nas doses administradas de OEP sejam capazes de inibir o apetite ou auxiliar com a redução de peso corporal de ratos Wistar com alimentação e pesos normais.

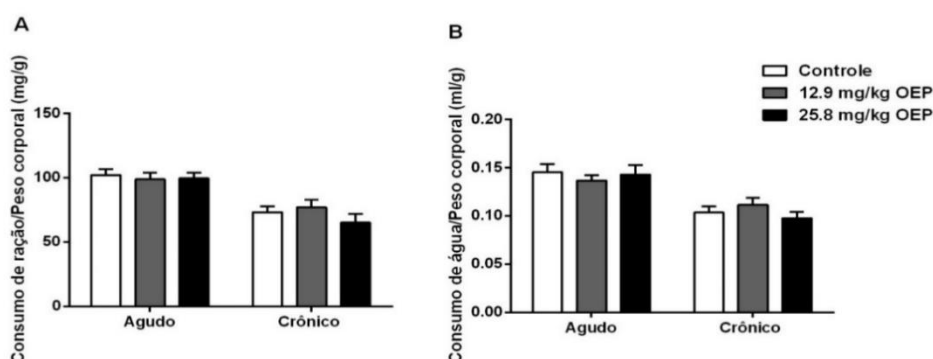


Figura 13: Efeito da suplementação com OEP sobre o consumo alimentar. A) Consumo de ração, B) Consumo de água. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA duas-vias. OEP, OxyElite Pro. Agudo, uma única administração de OEP; Crônico, 4 semanas de administração diária de OEP.

4.3.3 O OEP não altera a massa tecidual do coração, músculos esqueléticos e glândulas adrenais

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações produzidas pela suplementação crônica do OEP sobre a musculatura cardíaca e esquelética, assim como, o índice de estresse através dos pesos das glândulas adrenais, os tecidos foram retirados e pesados no final do período de suplementação. Nenhuma diferença entre os grupos suplementados (12,9 e 25, 8 mg/kg de OEP) foram observados comparados ao grupo controle nos tecidos avaliados como mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Efeito da suplementação crônica (4 semanas) com OEP sobre a massa tecidual.

Grupos	Gastrocnêmio/Peso Corporal (g/g)	Sóleo/Peso Corporal (mg/g)	Adrenal/Peso Corporal (mg/g)	Coração/Peso Corporal (g/g)
Controle	4.3 \pm 0.13	0.41 \pm 0.010	0.081 \pm 0.004	3.13 \pm 0.99
12,9 mg/kg OEP	4.4 \pm 0.13	0.44 \pm 0.012	0.078 \pm 0.005	3.24 \pm 0.06
25,8 mg/kg OEP	4.6 \pm 0.16	0.43 \pm 0.014	0.073 \pm 0.004	3.14 \pm 0.06

Dados são expressos como média \pm EPM. ANOVA duas-vias. OEP, OxyElite Pro.

4.4 RESULTADOS SOBRE OS EFEITOS DO OEP SOBRE SEU POTENCIAL HEPATOTÓXICO

4.4.1 O OEP por 4 semanas não produz efeitos tóxicos ao fígado

Como demonstrado na figura 14, os marcadores de lesão hepática circulante AST, ALT e GAMA-GT foram medidos no final do período de suplementação crônica. Similares níveis de AST (Controle, 54 ± 3 U/ml; 12,9 mg/kg de OEP, 55 ± 5 U/ml; 25,8 mg/kg de OEP, 55 ± 2 U/ml) e ALT (Controle, 36 ± 4 U/ml; 12,9 mg/kg de OEP, 37 ± 6 U/ml; 25,8 mg/kg de OEP, 31 ± 2 U/ml) foram encontrados nos grupos suplementados com 12,9 e 25,8 mg/kg de OEP comparados ao grupo controle (figura 14A). Na figura 14B nenhuma diferença nos níveis de GAMA-GT (Controle, $6,2 \pm 0,4$ U/L; 12,9 mg/kg de OEP, $6,9 \pm 0,5$ U/L; 25,8 mg/kg de OEP, $6,4 \pm 0,4$ U/L) foram observados entre os grupos após o final de 4 semanas de suplementação.

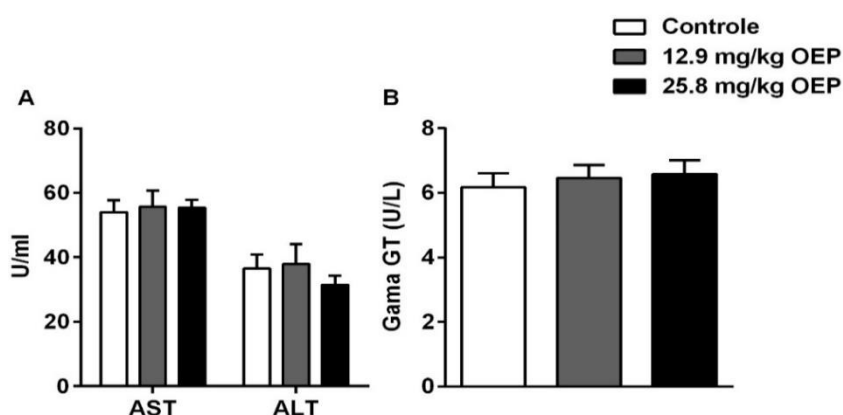


Figura 14: Efeito da suplementação com OEP sobre os marcadores de lesões hepáticas. A) Aspartato aminotransferase, AST e Alanina aminotransferase, ALT, B) γ -glutaminotransferase, GAMA-GT. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA duas-vias. OEP, OxyElite Pro. Crônico, 4 semanas de administração diária de OEP.

4.5 RESULTADOS SOBRE OS EFEITOS DO OEP SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.5.1 OEP reduz os níveis de TBARS E AOPP no músculo sóleo e fígado

A figura 15A mostra os níveis de TBARS tecidual e circulante avaliados após 4 semanas de suplementação com OEP. A suplementação com OEP não alterou os níveis de TBARS no plasma, gastrocnêmio porção vermelha e branca e no coração. Entretanto, o OEP com ambas as doses apresentou redução nos níveis de TBARS

no músculo sóleo (12,9 mg/kg de OEP, 36%; 25,8 mg/kg de OEP, 31%) e no fígado (12,9 mg/kg de OEP, 43%; 25,8 mg/kg de OEP, 25%).

Como o TBARS, um outro marcador de estresse oxidativo muito utilizado é AOPP que foi avaliado como mostra a figura 15B. Assim como no protocolo de TBARS, os níveis de AOPP no plasma, músculo gastrocnêmio porção vermelha e branca e no coração foram similares, ou seja, não houve diferença significativa entre os grupos suplementados com OEP comparado ao grupo controle. Embora, os níveis de TBARS no músculo sóleo tenham reduzido nos animais suplementados com OEP, nenhuma diferença significativa foi encontrada no protocolo de AOPP neste músculo, porém, uma tendência para a redução nos níveis de AOPP foi observado (12,9 mg/kg de OEP, 20%; 25,8 mg/kg, 15%, $p=0,11$). Similar aos resultados encontrados nos níveis de TBARS no fígado, a suplementação com OEP também foi capaz de reduzir os níveis de AOPP neste órgão (12,9 mg/kg de OEP, 39%; 25,8 mg/kg de OEP, 45%).

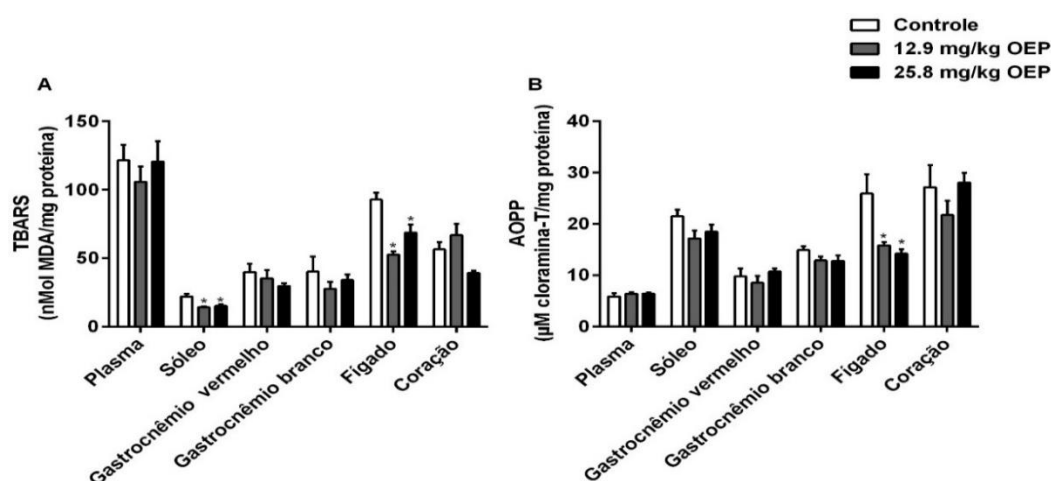


Figura 15: Efeito da suplementação com OEP sobre os marcadores de estresse oxidativo circulante e tecidual. A) Peroxidação lipídica. B) Oxidação de proteína. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA duas-vias e pós teste Bonferroni. * $p<0,05$ vs grupo controle. OEP, TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. AOPP, produtos avançados de oxidação proteica. OxyElite Pro. Crônico, 4 semanas de administração diária de OEP.

4.6 EFEITOS DO OEP SOBRE A BIOGÊNESE MITOCONDRIAL

4.6.1 Doses não recomendadas de OEP ingeridas a longo prazo reduz a expressão do RNAm do PGC-1 α sem alterar o conteúdo mitocondrial no músculo sóleo

A expressão do RNAm do PGC-1 α (figura 16A) e a quantidade do ND1 DNA (figura 16B) foram mensurados após 4 semanas de suplementação com OEP no

músculo sóleo, músculo este que apresenta predominância de fibras oxidativas. A expressão do RNAm do PGC-1 α reduziu 25% com a suplementação de 25,8 mg/kg de OEP quando comparado ao grupo controle, porém, nenhuma diferença foi observada com a suplementação de 12,9 mg/kg de OEP (figura 16A). A expressão do ND1 DNA, que é utilizado como um marcador de conteúdo mitocondrial total, não apresentou nenhuma alteração entre os grupos suplementados comparados ao grupo controle (figura 16B).

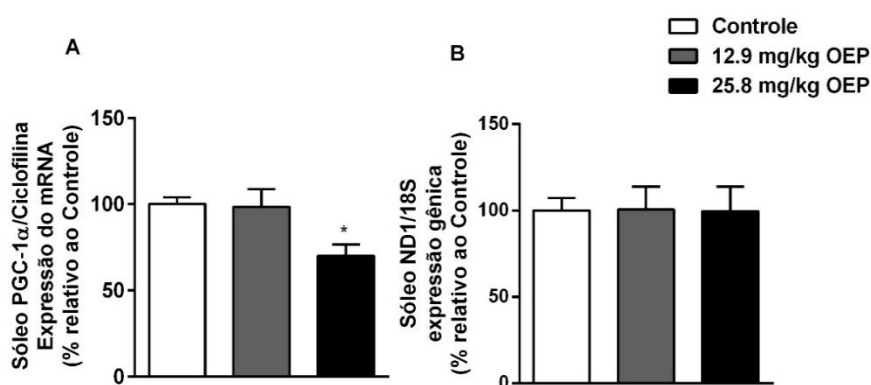


Figura 16: Efeito da suplementação com OEP sobre os marcadores de biogênese mitocondrial. A) Expressão do RNAm do PGC-1 α . B) Expressão do ND1 DNA. Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA duas-vias e pós teste Bonferroni. * $p < 0,05$ vs grupo controle. PGC-1 α , peroxissoma *proliferator activated receptor coativador 1 alpha*. ND1, NADH desidrogenase subunidade 1. OEP, OxyElite Pro. Crônico, 4 semanas de administração diária de OEP.

4.7 EFEITOS AGUDOS DO OEP SOBRE A RESPOSTAS HEMODINÂMICAS

4.7.1 A suplementação aguda de doses controladas de OEP é capaz de aumentar a pressão arterial e a frequência cardíaca de ratos normotensos

As medidas hemodinâmicas diretas foram mensuradas para verificar o efeito da suplementação aguda com OEP sobre a pressão arterial (sistólica, diastólica e média) e frequência cardíaca. Os efeitos mais evidentes sobre as respostas hemodinâmicas foram observados com 25,8 mg/kg de OEP. A PAS (figura 17A) e PAM (figura 17C) apresentaram um aumento após a suplementação com doses não recomendadas (25,8 mg/kg de OEP) no tempo de 30 minutos após a administração (PAS em 30 minutos; 10.66 mmHg no grupo 25,8 mg/kg de OEP; e PAM em 30 minutos; 10.21 mmHg no grupo 25,8 mg/kg de OEP) e permaneceu elevada até o tempo de 90 minutos (PAS em 60 e 90 minutos; 9,33 e 9,06 mmHg no grupo 25,8

mg/kg de OEP; e PAM em 60 e 90 minutos, 6,31 e 5,95 mmHg no grupo 25, mg/kg de OEP) quando comparado ao momento pré. Um aumento na PAD (figura 17B) também foi observado após 30 minutos a suplementação com doses não recomendadas e permanecendo elevada até o tempo de 60 minutos (PAD em 30 e 60 minutos, 6,78 e 5,08 mmHg no grupo 25,8 mg/kg de OEP). Contudo, a suplementação aguda com ambas as doses 12,9 e 25,8 mg/kg de OEP foram capazes de aumentar a FC (figura 17D) 30 minutos após a administração permanecendo elevada até 90 minutos quando comparados ao momento pré suplementação (FC em 30,60 e 90 minutos, 65, 38, 36 bpm em 12,9 mg/kg de OEP; e 52,48 e 46 bpm no grupo 25,8 mg/kg de OEP). Quando os dados foram comparados ao grupo controle um aumento foi observado apenas na PAD e PAM após 30 minutos, permanecendo com está diferença até 60 minutos nos animais suplementados com 25,8 mg/kg de OEP. De fato, nossos resultados sugerem que a administração aguda de doses altas e não recomendadas podem alterar as respostas hemodinâmicas, porém, um aumento de modo significativo foi observado com doses não recomendadas de OEP.

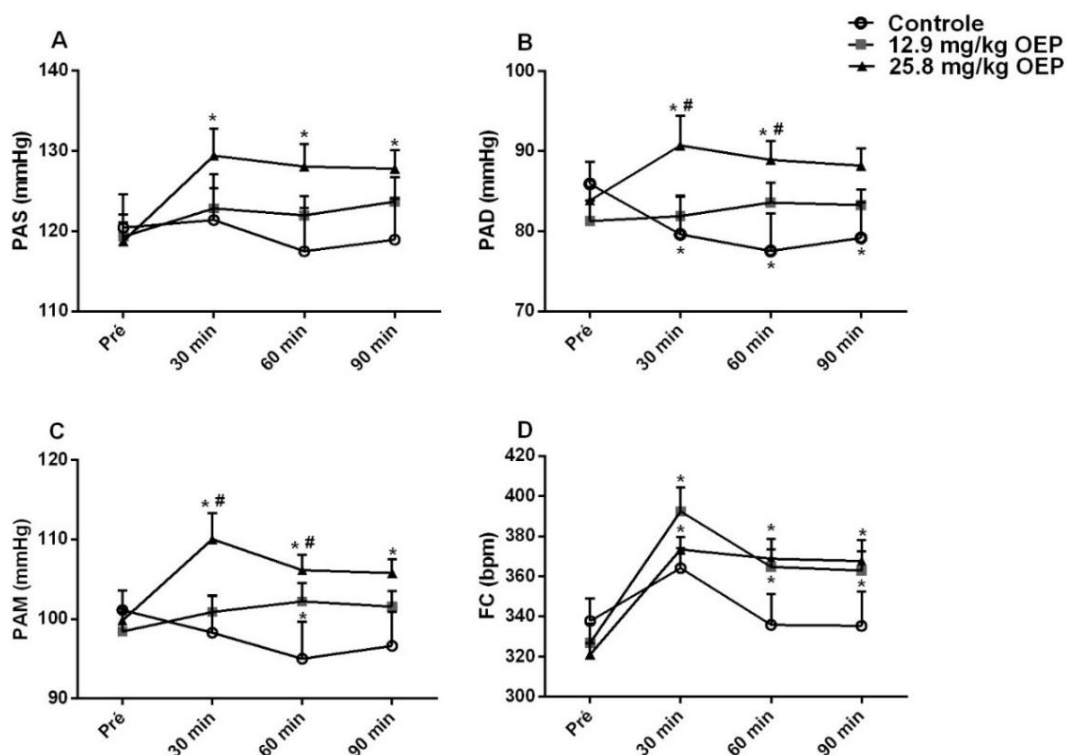


Figura 17: Efeito da suplementação aguda com OEP sobre as respostas hemodinâmicas. A) Pressão Arterial Sistólica (PAS). B) Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Média (PAM) e, D) Frequência Cardíaca (FC). Dados

expressos como média \pm EPM. ANOVA duas-vias e pós teste Bonferroni. * $p < 0,05$ vs momento pré; # $p < 0.05$ vs grupo controle. OxyElite Pro. Agudo, uma única administração de OEP.

5 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente trabalho indicam que uma única administração de OEP nas doses de 12,9 e 25,8 mg/kg de OEP é capaz de apresentar efeitos estimulantes sobre a capacidade de exercício, afetando de modo significativo a pressão arterial sanguínea (PAS, PAD e PAM) e FC principalmente após a ingestão de doses não recomendadas. Por outro lado, ambas as doses de OEP ingeridas por 4 semanas influenciaram negativamente para a diminuição da capacidade de realizar exercício. Além disso, estas doses de OEP ingerido de forma crônica também reduziu os marcadores de estresse oxidativo no músculo sóleo e no fígado. Consequentemente as doses não recomendadas reduziu a expressão RNAm do PGC-1 α no músculo sóleo. Nas demais variáveis analisadas: atividade locomotora espontânea, parâmetros comportamentais, peso corporal, ingestão de ração e água, massa tecidual, marcadores de lesão hepática (AST, ALT e GAMA-GT) e quantidade totais de mitocôndria no músculo esquelético não foram alteradas.

De fato, este trabalho é o primeiro na literatura a usar doses controladas de OEP em modelo animal. Apesar de ter sido observado um aumento na PA e FC, com doses não recomendadas, doses dentro do limite recomendado não apresentou quaisquer outros efeitos adversos relacionados ao uso deste suplemento. Principalmente porque estas respostas parecem estar associadas ao consumo de doses não controladas ou desconhecidas de OEP, bem como, o uso de álcool ou outros tipos de drogas (GEE *et al.*, 2010; GEE *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2012; ELGALLAB *et al.*, 2014; ARMSTRONG, 2012; SMITH *et al.*, 2014; KARNATOVSKAIA *et al.*, 2015). Além disso, não foi observado um potencial para auxiliar na perda de peso com a suplementação de OEP como prometido no rótulo do produto. Por outro lado, o presente estudo observou uma melhora no desempenho físico com administração aguda com OEP, enquanto que 4 semanas de administração diária diminui o desempenho dos animais suplementados. Acreditamos que os efeitos antioxidantes observados pela diminuição de TBARS e AOPP no músculo sóleo e no fígado, podem ter contribuído para a diminuição da expressão do PGC-1 α no músculo sóleo e assim prejudicando o desempenho aeróbio com o consumo a longo prazo deste suplemento.

Efeito estimulante sobre a capacidade de realizar exercício foi observado com a administração aguda de OEP com as doses 12,9 e 25,8 mg/kg de OEP, mas não com 4,3 mg/kg de OEP. Bloomer e colaboradores (2011) foi o único estudo

encontrado na literatura a avaliar os efeitos sobre o tempo de corrida em humanos, após a ingestão aguda do DMAA de forma isolado ou combinado a cafeína. Nenhum efeito foi observado sobre o tempo de corrida nos indivíduos suplementados quando comparados a condição placebo. Entretanto, os autores relatam que estes resultados podem ter sido devido ao uso prévio diário de cafeína, como informado pelos participantes, durante o protocolo experimental. O suplemento OEP é uma mistura de ingrediente que, além do DMAA, contém em sua formulação a cafeína, que já tem seus efeitos estimulantes bem descritos na literatura (RYU *et al.*, 2001; SPRIET, 2014). Estes efeitos estimulantes são descritos com a ingestão aguda de 6 mg/kg de cafeína em ratos e de 5 mg/kg de cafeína em humanos (RYU *et al.*, 2001). Um artigo de revisão publicado recentemente, descreveu um conjunto de resultados demonstrando que a ingestão aguda a partir de 3 mg/kg de cafeína é capaz de melhorar a performance física e a capacidade de endurance em modelo animal e em humanos (SPRIET, 2014). É notável que os resultados encontrados na literatura mostram que a partir de dose aguda de 3 mg/kg de cafeína apresenta efeito ergogênico sobre o desempenho físico, entretanto, como a falta de dados sobre os efeitos do DMAA, nossos resultados podem ser parcialmente explicados pelo efeito estimulante da cafeína presente no OEP.

De acordo com o rótulo do OEP, cada cápsula de suplemento contém 100 mg de cafeína. Consequentemente, a dosagem de cafeína usada em ambos os grupos (12,9 e 25,8 mg/kg de OEP) que apresentaram efeito estimulante sobre a capacidade de exercício possuem respectivamente as concentrações de 4,3 e 8,6 mg/kg de cafeína. Estas concentrações de cafeína presente em cada dose de OEP utilizada neste estudo, são maiores que o necessário (3 mg/kg de cafeína) para aumentar a atividade física quando ingerida de forma aguda. Ainda, o resultado encontrado no grupo suplementado com 4,3 mg/kg de OEP, onde não foi observado um efeito estimulante sobre a performance durante o exercício, ingeriu aproximadamente 1,4 mg/kg de cafeína. Esta quantidade de cafeína presente no grupo 4,3 mg/kg de OEP é menor que a concentração mínima necessária para resultar em um efeito estimulante sobre a performance física. (RYU *et al.*, 2001; SPRIET, 2014). Com base nesses dados, acreditamos que o efeito estimulante sobre o TTE observado após a administração aguda das doses de 12,8 e 25,9 mg/kg de OEP é mais provável devido à cafeína no suplemento em vez da quantidade de DMAA ou qualquer outro ingrediente presente no suplemento.

Efeitos opostos aos achados com a administração aguda no TTE, foram observados após 4 semanas de suplementação diária com OEP. Os animais suplementados por 4 semanas com ambas as doses de OEP, tiveram um prejuízo no TTE. Até o momento, nenhum estudo avaliou os efeitos crônico do OEP sobre a capacidade de exercício, o que torna difícil de comparar nossos resultados com outros estudos. Entretanto, sugerimos que o efeito estimulante da cafeína possa ter sido parcialmente responsável pela melhora no desempenho, quando o suplemento OEP foi ingerido de forma aguda. Seguindo esta linha, dados na literatura apontam uma tolerância ao efeito estimulante da cafeína quando ingerida de forma aguda por usuários desta substância (ingestão de ≥ 300 mg de cafeína/dia) comparados a não usuários (ingestão de ≤ 50 mg de cafeína/dia) durante um teste de ciclo-ergômetro. Tanto a duração como a magnitude do efeito ergogênico observado nos indivíduos não usuário foram maiores (ainda evidente 6 horas após a administração) comparados aos indivíduos usuários seguido a administração aguda de 5 mg/kg de cafeína (BELL & MCLELLAN, 2002).

A tolerância aos efeitos estimulantes da suplementação por 4 semanas com baixas doses de cafeína (3 mg/kg de cafeína) sobre a performance de endurance (atividades físicas aeróbicas, neste caso, um teste incremental de esforço até a exaustão voluntária em um cicloergômetro) foi observada pelo grupo de Beaumont e colaboradores (2016). O grupo que ingeriu a cafeína de forma crônica apresentou uma menor reposta durante o exercício quando comparados ao grupo que ingeriu esta substância de forma aguda. Com estes dados, se torna evidente que indivíduos habituados a ingerir cafeína diariamente deve abster-se da suplementação crônica desta substância, para maximizar os benefícios aos efeitos estimulantes produzido com a ingestão aguda de cafeína (BEAUMONT *et al.*, 2016). Estes conjuntos de dados encontrados na literatura corroboram para um possível efeito estimulante associado a cafeína, presente no OEP, quando ingerido de forma aguda e por outro lado, quando ingerida de forma crônica uma tolerância ao seu efeito estimulante é observado. No entanto, além dos dados descritos envolvendo a cafeína, outros possíveis mecanismo ajudam a explicar o prejuízo encontrado no TTE com a suplementação crônica do OEP como: o efeito antioxidante do OEP no músculo sóleo e no fígado e a redução da expressão do RNAm do PGC-1 α no músculo sóleo encontrados no presente estudo.

Após os resultados encontrados no TTE, esperávamos que a suplementação aguda com OEP aumentasse de forma semelhante a atividade locomotora espontânea dos animais, assim como, após 4 semanas de suplementação esperávamos que uma redução na locomoção ocorresse. Nenhuma diferença significativa foi observada sobre as variáveis de atividade locomotora espontânea com ambas as doses de OEP tanto com a ingestão aguda quanto crônica. Apenas uma tendência ao efeito estimulante sobre a atividade locomotora espontânea foi observada com a suplementação aguda com altas doses de OEP e uma clara tendência a reduzir a locomoção quando doses não recomendadas foram ingeridas diariamente a longo prazo. Até o momento ninguém tinha estudado os efeitos do OEP sobre a atividade locomotora espontânea em ratos Wistar. O único estudo sobre os efeitos do DMAA que é um dos ingredientes presente no OEP foi desenvolvido por Dolan e colaboradores (2014) que avaliaram os efeitos deste ingrediente isolado sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos (Swiss-Webster). Os autores observaram que a administração aguda do DMAA induziu efeitos depressivos sobre a locomoção dentro de 0 a 30 minutos e duraram até 50 a 70 minutos, está depressão ocorreu de forma dose-dependente (0,1, 0,3, 1, 3 e 10 mg/kg de DMAA injetado via intraperitoneal) comparado ao veículo. Por outro lado, após 120 a 180 minutos um aumento na atividade locomotora espontânea foi observado no grupo que recebeu 10 mg/kg de DMAA. Estes dados aparentemente disparatados podem ser atribuídos ao fato de que o suplemento OEP tem uma quantidade indeterminada de DMAA (não possui informação no rótulo do produto), além de, conter a cafeína em sua formulação o que dificulta a uma comparação. Além disso, vale ressaltar que o TTE os animais foram estimulados a manter-se sempre em locomoção, já que a esteira se mantém sempre em movimento, o que não acontece durante a execução do teste de campo aberto.

A cafeína é uma droga psicoestimulante que apresenta efeito bifásico sobre a atividade locomotora espontânea quando ingerida de forma aguda (GARRETT & HOLTZMAN, 1994; FISONE *et al.*, 2004; HALLDNER *et al.*, 2004). Este efeito bifásico associado a cafeína são descritos sobre a locomoção tanto em ratos quanto em camundongos. O aumento no comportamento locomotor é observado com pequenas e moderadas doses de cafeína (15 e 30 mg/kg de cafeína), enquanto doses mais elevadas (≥ 100 mg/kg de cafeína) são ineficientes ou reduz a locomoção (GARRETT & HOLTZMAN, 1994; FISONE *et al.*, 2004). Este aumento da

atividade locomotora com doses baixas e moderadas acontece de modo dose dependente (GARRET & HOLTZMAN, 1994). Holtzman & Finn, (1988) demonstraram que a administração a longo prazo com a cafeína é capaz de desenvolver uma tolerância ao efeito estimulante sobre a atividade locomotora de ratos Sprague-Dawley (Holtzman & Finn, 1988). Os principais ingredientes estimulantes do OEP (DMAA e cafeína) apresentam efeitos distintos sobre a atividade locomotora espontânea de acordo com a dose e ao tempo de exposição, bem como, o fato do OEP conter uma mistura de substâncias fica difícil comparar nossos resultados aos resultados encontrados na literatura. Além disso, embora a quantidade de cafeína seja informada no rótulo do produto, (100 mg em uma cápsula de OEP) a quantidade do DMAA encontrada no suplemento é desconhecida, ou seja, não é informada no rótulo pelo fabricante do produto.

Para o nosso conhecimento, não existem estudos na literatura sobre os efeitos do OEP e do DMAA sobre parâmetros de ansiedade ou comportamentais seja em humanos ou em animal. Forrester e colaboradores (2013) descreveram alterações comportamentais como: agitação/irritabilidade em 8,9% e tremor em 7,1% dos casos associados a indivíduos que fizeram o uso de produtos contendo DMAA (FORRESTES *et al.*, 2013). Ainda, a cafeína é bem conhecida para promover um comportamento ansioso em seres humanos e em modelo animal. Yacoubi e colaboradores (2000) mostraram efeitos ansiogênicos tanto com a administração aguda e crônica com cafeína em camundongos submetidos ao teste de LCE. Apesar de alguns efeitos comportamentais serem associados ao uso do DMAA e da cafeína, no presente estudo nenhum efeito foi observado nas variáveis analisadas através do LCE com a suplementação do OEP.

O OEP foi vendido principalmente como um queimador de gordura auxiliando na rápida perda de peso. Mesmo que uma das finalidades do OEP seja a perda de peso corporal, no presente estudo não encontramos diferença no peso e no consumo alimentar dos animais suplementados com OEP. No entanto, os dados encontrados na literatura são controversos sobre este assunto. O efeito na redução do peso corporal e do apetite foi descrito com 1 ou 2 doses de OEP após 2 semanas (FARNEY *et al.*, 2012) e com 8 semanas de ingestão (MCCARTHY *et al.*, 2012). Estes resultados vão contra aos dados encontrados neste estudo, porém, vale ressaltar que em ambos os estudos em questão (FARNEY *et al.*, 2012; MCCARTHY *et al.*, 2012, além dos sujeitos estarem regularmente comprometidos em protocolos

de atividade física, (o que pode ter contribuído para a perda de peso) estes estudos também foram financiados pelo fabricante do OEP, ou seja, pela USPlabs. Por outro lado, nossos resultados corroboram com o estudo publicado pelo grupo de Whitehead e colaboradores (2012) que não encontraram efeitos sobre o peso corporal após a suplementação com 1-3 cápsulas de OEP durante um período de 10 semanas de suplementação, neste caso, os participantes não realizavam qualquer protocolo de treinamento de exercício durante o período em que o estudo foi desenvolvido (WHITEHEAD *et al.*, 2012).

Mesmo que nenhuma alteração comportamental, de estresse, peso corporal e metabolismo tenha sido evidente, nós observamos que os animais após a suplementação crônica com OEP apresentavam uma maior perda de pelo comparados ao grupo controle, como representado na figura 18.



Figura 18: Efeito da suplementação com OEP sobre a perda de pelos.

Diversos efeitos adversos são descritos na literatura associado ao uso de produtos contendo DMAA, dentre eles incluem: taquicardia, náusea, vômitos, agitação, tremor, tontura, cefaleia, confusão, sonolência, dor torácica, palpitações e fala arrastada (FARNEY *et al.*, 2012; FORRESTER *et al.*, 2012). Ainda, efeitos mais graves e com risco de vida também têm sido descritos como: infarto agudo do miocárdio (SMITH *et al.*, 2014), parada cardíaca (KARNATOVSKAIA *et al.*, 2015), hemorragia cerebral (GEE *et al.*, 2010, GEE *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2012) e morte (ELIASON *et al.*, 2012; ARCHER *et al.*, 2015). Na maioria dos eventos cardíacos adversos, o aumento da pressão arterial era evidente. Entre 2010-2011 de todos os casos comunicados ao *Texas Poison Center Network*, 3,6% destes casos eram associados a hipertensão. Um aumento nas respostas hemodinâmicas foi evidente em estudos clínicos realizados em humanos após a suplementação aguda com produtos contendo DMAA (FARNEY *et al.*, 2012; MCCARTHY *et al.*, 2012) entretanto, nenhum efeito sobre as variáveis hemodinâmicas foi evidente

quando estes produtos foram ingeridos de forma crônica (14 dias e 10 semanas) (FARNEY *et al.*, 2012; WHITEHEAD *et al.*, 2012). Os aumentos nas respostas hemodinâmicas foram observados em 30 minutos permanecendo até o tempo de 120 minutos após a ingestão aguda com 2 cápsulas de OEP, estas alterações ocorreram principalmente sobre a PAS e FC (FARNEY *et al.*, 2012; MCCARTHY *et al.*, 2012).

Ao avaliar o efeito do DMAA (50 e 75 mg) e da cafeína (250 mg) isolado ou combinado ingeridos de forma aguda, os resultados apresentaram um aumento na PAS, PAD sem afetar a FC (BLOOMER *et al.*, 2011). Estes efeitos sobre o aumento das respostas hemodinâmicas com a ingestão aguda do OEP corroboram com os resultados encontrado no presente estudo. Neste estudo, efeitos do suplemento em alterar a PAS, PAD e FC foram evidentes com a ingestão aguda de 25,8 mg/kg de OEP o que equivale a dose não recomendada do suplemento. Por outro lado, a dose máxima recomendada (12,9 mg/kg de OEP) utilizada neste estudo como descrito no rótulo do OEP foi capaz de aumentar a capacidade de exercício sem afetar de forma significativa as respostas hemodinâmicas.

Diversos estudos também associaram efeitos hepatotóxicos ao uso do OEP como: hepatite aguda e lesão hepática. Dentre os vários estudos, apenas sete apresentaram os níveis dos marcadores de lesão hepática (AST, ALT e GAMA-GT). Destes, três estudos mostraram altos níveis de AST e ALT associados com altas ou desconhecidas doses de produtos contendo DMAA, ao uso de álcool ou outras drogas e atividade física extenuante (YOUNG *et al.*, 2012; FOLEY *et al.*, 2014; JOHNSTON *et al.*, 2015). Por outro lado, semelhantes aos nossos achados, outros quatros estudos não observaram alterações dos níveis de marcadores de lesão hepática (AST, ALT e GAMA-GT) nos grupos suplementados com OEP (média de 2 cápsulas/dia) ou DMAA de forma isolada (50 mg/dia) (BLOOMER *et al.*, 2013; FARNEY *et al.*, 2012; MCCARTHY *et al.*, 2011, WHITEHEAD *et al.*, 2012). Diferente dos estudos que observaram efeitos hepatotóxicos e semelhantes ao presente trabalho, esses estudos que não apresentaram alterações nos níveis de AST, ALT e GAMA-GT também usaram doses controladas de OEP como recomendada no rótulo do produto e não foram associados a nenhuma outra droga.

Suplementos capazes de aumentar a concentração de antioxidantes dentro da célula muscular têm recebido muita atenção como estratégia para prevenir ou reduzir o estresse oxidativo, assim resultando em uma maior proteção contra

agentes oxidantes contribuindo de modo a reduzir a fadiga e melhorar o desempenho físico (GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2008; PETERNELJ & COOMBES, 2011). De fato, os achados são consistentes do efeito da suplementação com antioxidante atenuar o estresse oxidativo gerado durante o exercício, porém, um corpo crescente de dados indica efeitos prejudiciais da suplementação com antioxidante sobre os benefícios do desempenho durante o treinamento físico (PETERNELJ & COOMBES, 2011). As ROS são importantes sinalizadores e exercem efeitos favoráveis envolvidos no processo de adaptação causado pelo exercício (GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2008; JORNAYVAZ & SHULLMAN, 2010). Nossos achados indicam um potencial antioxidante para o OEP, entretanto, são poucos os resultados sobre os efeitos antioxidantes deste suplemento encontrado na literatura. Apenas dois estudos na literatura descreveram os efeitos do DMAA isolado ou combinado (BLOOMER *et al.*, 2013) ou como suplemento OEP (MCCARTHY *et al.*, 2011) sobre parâmetros de estresse oxidativo. Um deles sem efeito sobre as variáveis analisadas (BLOOMER *et al.*, 2013).

McCarthy e colaboradores (2011) observaram uma redução dos níveis plasmáticos do MDA no grupo suplementado com 2 cápsulas de OEP ingerido por 8 semanas comparado a condição placebo (MCCARTHY *et al.*, 2011). Estes dados corroboram com os achados do presente estudo, onde também observamos uma redução nos níveis de TBARS e AOPP no músculo sóleo e fígado. Ainda, dados sobre o papel antioxidante do ingrediente cafeína presente no OEP já estão bem estabelecidos. Barcelos e colaboradores (2014) observaram uma redução dos níveis de MDA no fígado de ratos treinados após a suplementação por 4 semanas com 6 mg/kg de cafeína (BARCELOS *et al.*, 2014). Contudo, uma vez que o OEP contém uma mistura de ingredientes, não podemos excluir possíveis efeitos antioxidantes de outras substâncias presentes na formulação do suplemento, assim como, atribuir tais efeitos exclusivamente a cafeína.

O efeito antioxidante do OEP, observado no presente estudo, ajuda explicar parcialmente o prejuízo na capacidade de exercício e na diminuição da expressão do *Peroxisoma proliferator activated receptor coativador 1 alpha* (PGC-1 α). Já que as ROS são essenciais sinalizadores moleculares que contribuem para *up-regulation* da expressão de diversos genes, incluindo os genes relacionados a mitocôndriogênese como o PGC-1 α . Esta proteína é o maior regulador do metabolismo energético e da biogênese mitocondrial (GOMEZ-CABRERA *et al.*,

2008; JORNAYVAZ & SHULLMAN, 2010). A biogênese mitocondrial pode ser definida como o crescimento e a divisão das mitocôndrias pré-existentes (JORNAYVAZ & SHULLMAN, 2010). A mitocôndria através da cadeia transportadora de elétrons são os principais geradores de ROS. Estes radicais livres não são sempre prejudiciais às células, em muitos casos, servem como sinalizadores para adaptar as células musculares ao exercício através da modulação da expressão gênica (GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2008).

O PGC-1 α desenvolve um importante papel na regulação da biogênese mitocondrial e no metabolismo energético. O PGC-1 α é um fator de regulação co-transcricional que induz a biogênese mitocondrial por ativação de diferentes fatores de transcrição, incluindo fator respiratório nuclear-1 (NRF-1) e fator respiratório nuclear-2 (NRF-2) que promovem a expressão do fator de transcrição A mitocondrial (Tfam) resultando no aumento da transcrição das principais enzimas mitocondriais. Este último impulsiona a transcrição e replicação do DNA mitocondrial (JORNAYVAZ & SHULLMAN, 2010). Gomez-Cabrera e colaboradores (2008) mostraram que a suplementação crônica com antioxidante (3 a 6 semanas) reduz a capacidade de endurance (tempo de corrida) e impede o aumento da mitocondriogênese e da expressão de fatores de transcrição chave envolvidos na biogênese mitocondrial no músculo gastrocnêmio em animais treinados (GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2008). Estes resultados corroboram com os dados encontrados no presente estudo.

Resultados controversos aos dados do presente estudo são observado em relação ao OEP e a cafeína quando avalia-se marcadores da biogênese mitocondrial em modelo de cultura celular. O aumento na expressão do RNAm, da proteína do PGC-1 α e do metabolismo mitocondrial foram observados em células do músculo esquelético após 24 e 48 horas a incubação com OEP (VAUGHAN *et al.*, 2012a). No presente estudo foi observado *in vivo* uma diminuição da expressão do RNAm do PGC-1 α e um conteúdo mitocondrial inalterado no músculo sóleo, o principal músculo oxidativo do membro posterior de rato. Além disso, há também estudos em cultura de células demonstrando que a cafeína é capaz de aumentar marcadores de biogênese mitocondrial como PGC-1 α , melhorar a função mitocondrial e a biogênese (OJUKA *et al.*, 2003; MCCONELL *et al.*, 2010; VAUGHAN *et al.*, 2012b). Dados estes que vão contra ao encontrado no presente estudo. Entretanto, os dados destes estudos são difíceis de comparar com os resultados do atual trabalho, uma

vez que, nestes estudos foram utilizados modelo de cultura celular e as doses de cafeína e/ou OEP não podem ser convertidas para doses em seres humanos.

Além da tolerância aos efeitos estimulantes de ingredientes presentes no OEP, principalmente à cafeína como já demonstrado, um outro fator que pode reforçar a explicar o prejuízo no desempenho físico após a suplementação crônica com OEP é o efeito antioxidante observado com a diminuição do TBARS e AOPP no músculo sóleo e fígado. Este efeito antioxidante pode estar contribuindo com a redução da expressão do PGC-1 α e assim, diminuir o desempenho aeróbio após a suplementação por 4 semanas com OEP.

Em resumo, nosso estudo é o primeiro a usar doses recomendadas de OEP em modelo animal. Não observamos efeitos adversos semelhantes aos descritos na literatura, principalmente porque essas respostas estão associadas a doses desconhecidas ou não controladas de OEP, bem como, ao uso de drogas e bebidas alcoólicas. De fato, o aumento da PA e FC foram observados após a suplementação aguda com doses não recomendadas de OEP. Também, não observamos efeito na perda de peso com o uso do OEP como prometido no rótulo do produto. Por outro lado, a administração aguda de OEP aumentou o desempenho físico, enquanto a sua administração crônica após o período por 4 semanas diminuiu a capacidade de exercitar dos animais suplementados. Acreditamos que o efeito antioxidante observado pela redução dos níveis de TBARS e AOPP no músculo sóleo e no fígado podem ter contribuído com a supressão da expressão do RNAm do PGC-1 α no músculo sóleo. Estes efeitos podem ter contribuído no prejuízo observado no desempenho aeróbio dos animais suplementados a longo prazo, entretanto, a tolerância ao efeito estimulante aos compostos presente no OEP, principalmente a cafeína como já demonstrado, pode ser outro mecanismo que ajude a explicar parcialmente o efeito negativo no TTE associado a suplementação crônica deste suplemento.

6 CONCLUSÃO

Concluindo, nossos resultados sugerem que:

1. Doses máximas e não recomendadas de OEP ingerido de forma aguda apresenta efeitos estimulantes sobre a capacidade de exercício.
2. Adicionalmente, a suplementação aguda com doses não recomendadas de OEP afeta de modo incremental as respostas hemodinâmicas.
3. Por outro lado, a suplementação por 4 semanas com doses máximas e não recomendadas de OEP apresenta um prejuízo na capacidade de exercício.
4. A suplementação com OEP não apresenta efeito sobre a atividade locomotora espontânea e sobre parâmetros comportamentais.
5. Nenhum efeito com a suplementação de OEP é observado sobre o peso corporal, consumo de ração e água e massa tecidual.
6. A administração por 4 semanas com ambas as doses de OEP não apresenta efeito sobre os marcadores de lesão hepática (AST, ALT e GAMA-GT).
7. Por outro lado, a utilização de ambas as doses de OEP por um período de 4 semanas resulta na redução dos níveis de TBARS no músculo sóleo e no fígado e da AOPP no fígado.
8. O consumo de doses maiores ao máximo descrito no rótulo do OEP contribui para supressão da expressão gênica do PGC-1 α no músculo sóleo o que pode explicar parcialmente a redução no desempenho físico dos animais suplementados a longo prazo.

7 REFERÊNCIAS

ABIAD. Pesquisa inédita aponta que mais da metade dos lares brasileiros consome suplementos alimentares. <http://abiad.org.br/pesquisa-inedita-aponta-que-mais-da-metade-dos-lares-brasileiros-consome-suplementos-alimentares/>. 2016

ALVES, C. & LIMA, R.V.B. Dietary supplement use by adolescents. **Jornal de pediatria**. v.85, n.4, p.287–294, 2013.

ARCHER, J. R. H. *et al.* Trend analysis of anonymised pooled urine from portable street urinals in central London identifies variation in the use of noval psychoactive substances. **Clinical Toxicology**. v. 52, p. 160-165, 2014.

ARCHER, J. R. H. *et al.* Running an unknown risk: a marathon death associated with the use of 1,3-dimethylamylamine (DMAA). **Drug Testing and Analysis**. v. 7, n. 5, p. 433-438, 2015.

ARMSTRONG M. Atrial Fibrillation with Rapid Ventricular Response following use of Dietary Supplement Containing 1,3 Dimethylamylamine and Caffeine. **Journal Special Operations Medicine**. v. 12, n. 4. p. 1-4, 2012.

BARCELOS, R. P. *et al.* Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. **Life Sciences**. V. 96, n. 1, p. 40-45, 2014.

BEAUMONT, R. *et al.* Chronic ingestion of a low dose of caffeine induces tolerance to the performance benefits of caffeine. **Journal of Sports Sciences**. v. ?, n. ?, p.1-8, 2016.

BELL, D. G.; MCLELLAN, T. M. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. **Journal of Applied Physiology**. v. 93, n. 4, p. 1227-1234, 2002.

BLOOMER, R. J. *et al.* Effects of 1,3-Dimethylamylamine and Caffeine Alone or in Combination on Heart Rate and Blood Pressure in Healthy Men and Women. **The Physician and Sports medicine**. v. 39, n. 3, p. 111–120, 2011a.

BLOOMER, R. J. *et al.* Effect of Caffeine and 1,3-demethhtlyamylamine on Exercise Performance and Blood Markers of Lipolysis and Oxidative Stress in Trained Men and Women. **Journal of Caffeine Research**. v. 1, n. 3, p.169-177, 2011b.

BLOOMER, R. J. *et al.* Safety profile of caffeine and 1,3-dimethylamylamine supplementation in healthy men. **Human & Experimental Toxicology**. v.32, n.11, p.1126-1136, 2013.

CARPENTER, D. Strengthen and stabilize the FDA. **Nature**. v. 485, p.169-170, 2012.

DI LORENZO, C. *et al.* Could 1,3 dimethylamylamine (DMAA) in food supplements have a natural origin?. **Drug Testing and Analysis**. v. 5, n. 2, p. 116-121, 2013.

DOLAN, S. B.; GATCH, M. B. Abuse liability of the dietary supplement dimethylamylamine. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 146, n. 1, p. 97-102, 2014.

DUNN, M. Have prohibition policies made the wrong decision? A critical review of studies investigating the effects of DMAA. **International Journal of Drug Policy**. v. 2010, p. 1126- 1136, 2016.

ELIASON, M. J. *et al.* Case reports: Death of active duty soldiers following ingestion of dietary supplements containing 1,3-dimethylamylamine (DMAA). **Military Medicine**. v. 177, n.12, p.1455–1459, 2012.

EUDY, A. N. *et al.* Efficacy and safety of ingredients found in preworkout supplements. **American Society of Health-System Pharmacists**. v. 70, n.1, p.577-588, 2013.

FARNEY, T. M. *et al.* Hemodynamic and Hematologic Profile of Healthy Adults Ingesting Dietary Supplements Containing 1,3-Dimethylamylamine and Caffeine. **Nutrition and Metabolic Insights**. v. 5, p. 1-12, 2012.

FDA. DMAA in Dietary Supplements. <http://www.fda.gov/food/dietarysupplements/qdietarysupplements/ucm346576.htm>. 2013.

FISONE, G. *et al.* Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 61, n. 7, p. 857-872, 2004.

FLEMING, H. L. *et al.* Analysis and confirmation of 1,3-DMAA and 1,4-DMAA in geranium plants using high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry at ng/g concentrations. **Analytical Chemistry Insights**. v. 7, n. 1, p.59-78, 2012.

FOLEY, S. *et al.* Experience with OxyELITE Pro and Acute Liver Injury in Active Duty Service Members. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 59, n. 12, p. 3117-3121, 2014.

FORRESTER, M. B. Exposures to 1,3-dimethylamylamine-containing products reported to Texas poison centers. **Human and Experimental Toxicology**. v. 32, n. 1, p.18-23, 2013.

GARCÍA-CORTÉS, M. *et al.* Hepatotoxicity by Dietary Supplements: A Tabular Listing and Clinical Characteristics. **International Journal of Molecular Sciences**. v.17, n.4, p. 537-560, 2016.

GARRETT, B. E.; HOLTZMAN, S. G. D₁ and D₂ dopamine receptor antagonists block caffeine-induced stimulation of locomotor activity in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 47, n. 1, p.89-94, 1994.

GEE, P. *et al.* Another bitter pill: a case of toxicity from DMAA party pills. **Journal of the New Zealand Medical Association**. v. 123, n. 1327, p.124-127, 2010.

GEE, P. *et al.* Use of recreational drug 1,3-dimethylethylamine (DMAA) associated with cerebral hemorrhage. **Annals of Emergency Medicine**. v. 60, n. 4, p.431-434, 2012.

GELLER, A. I. *et al.* Emergency Department Visits for Adverse Events Related to Dietary Supplements. **The New England Journal of Medicine**. v. 373, n.16, p.1531-1540, 2015.

GOMEZ-CABRERA, M. C. *et al.* Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 87, n. 1, p. 142-149, 2008.

HALLDNER, L. *et al.* The adenosine A1 receptor contributes to the stimulatory, but not the inhibitory effect of caffeine on locomotion: a study in mice lacking adenosine A1 and/or A2A receptors. **Neuropharmacology**. v. 46, n. 7, p. 1008-1017, 2004.

HOLTZMAN, S. G.; FINN, I. B. Tolerance to behavioral effects of caffeine in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 29, n. 2, p. 411-418, 1988.

JOHNSTON, D. I. *et al.* Hepatotoxicity associated with the dietary supplement OxyELITE Pro??? - Hawaii, 2013. **Drug Testing and Analysis**. v. 8, n. 3, p. 319-327, 2016.

JORNAYVAZ, F.; SHULMAN, G. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays Biochem**. v. 47, p. 69-84, 2010.

KARNATOVSKAIA, L. V. *et al.* Cardiac Arrest in a 21-Year-Old Man After Ingestion of 1 ,3-DMAA – Containing Workout Supplement. **Clinical Journal of Sport Medicine**. v. 25, n. 1, p. 2014-2016, 2014.

LEAL, M. A. *et al.* Mechanisms of Enhanced Vasoconstriction in the Mouse Model of Atherosclerosis: the Beneficial Effects of Sildenafil. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 16, n. 6, p. 517-530, 2015.

LI, J. S. *et al.* Identification and quantification of dimethylamylamine in geranium by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry Insights**. v. 7, n. 1, p. 47-58, 2012.

LIU, Y.; SANTILHO, M. F. Cytochrome P450 2D6 and 3^a4 enzyme inhibition by amine stimulants in dietary supplements. **Drug Testing and Analysis**. v. 8, n. 3, p.307-310, 2015.

MCCARTHY, C. G. *et al.* A Finished Dietary Supplement Stimulates Lipolysis and Metabolic Rate in Young Men and Women. **Nutrition Metabolic Insights**. v.5, p.23-31, 2012.

MCCARTHY, C. G. *et al.* Biochemical and Anthropometric Effects of a Weight Loss Dietary Supplement in Healthy Men and Women. **Nutrition and Metabolic Insights**. v. 5, p. 13-22, 2011.

MCCONELL, G. K. *et al.* Central role of nitric oxide synthase in AICAR and caffeine-induced mitochondrial biogenesis in L6 myocytes. **Journal Applied Physiology**. v. 108, p. 589-595, 2010.

MIYA, T. S.; EDWARDS, L. D. A pharmacological Study of Certain Alkoxyalkylamines. **Journal of The American Pharmaceutical Association**. v. 42, n. 2, p.107-110, 1952.

O'DEA, J.A. Consumption of nutritional supplements among adolescents: usage and perceived benefits. **Health education research**. v. 18, n.1, p.98–107, 2003.

OJUKA, E. O.*et al.* Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. **The FASEB Journal**. v. 17, n. 6, p.675-681, 2003.

PETERNELJ, T. T.; COOMBES, J. S. Antioxidant supplementation during exercise training: beneficial or detrimental?. **Sports Medicine**. v. 41, n. 12, p.1043-1069, 2011.

PIPE, A.; AYOTTE, C. Nutritional supplements and doping. **Clinical journal of sport medicine: official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine**. v.12, n.4, p.245–249, 2002.

POWERS, M. E. Acute Stimulant Ingestion and Neurocognitive Performance in Healthy Participants. **Journal of Athletic Training**. v. 50, n. 1, p. 453-459, 2015.

RODRICKS, J. V. *et al.* Pharmacokinetic Data Distinguish Abusive Versus Dietary Supplement Uses of 1,3-Dimethylamylamine. **Annals of Emergency Medicine**. v. 61, n. 6, p. 718-719, 2013.

ROYTMAN, M. M. *et al.* Outbreak of Severe Hepatitis Linked to Weight-Loss Supplement OxyELITE Pro. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 109, n. 8, p.1296-1298, 2014.

RYU, S. *et al.* Caffeine as a Lipolytic Performance Food Component in Rats and Athletes. **Journal of Nutrition Science Vitaminol**. v. 47, n. 14, p. 139-146, 2001.

SCHILLING, B. K. *et al.* Physiological and pharmacokinetic effects of oral 1,3-dimethylamylamine administration in men. **BMC Pharmacology Toxicology**. v. 14, n. 52, p. 1-10, 2013.

SMITH, T. B. *et al.* Acute Myocardial Infarction Associated with Dietary Supplements Containing 1,3-Dimethylamylamine and Citrus aurantium. **Texas Heart Institute Journal**. v. 41, n. 1, p. 70-72, 2014.

SPRIETT, L. L. Exercise and Sport Performance with Low Doses of Caffeine. **Sports Medicine**. Sports Medicine. 2014. p. 175–184, 2014.

VAUGHAN, R. A. *et al.* Effects of Caffeine on Metabolism and Mitochondria Biogenesis in Rhabdomyosarcoma Cells Compared with 2,4-Dinitrophenol. **Nutrition and Metabolic Insights**. v. 5, p. 59-70, 2012b.

VAUGHAN, R. A. *et al.* Treatment of human muscle cells with popular dietary supplements increase mitochondrial function and metabolic rate. **Nutrition & Metabolism**. v. 9, n. 1, p. 101-111, 2012.

VENHUIS, B. J. KASTE, D. DE. Scientific Opinion on the Regulatory Status of 1,3-Dimethylamylamine (DMAA). **European Journal of Food Research & Review**. v. 2, n. 4, p. 93-100, 2012.

VORCE, S. P. *et al.* Dimethylamylamine: a drug causing positive immunoassay results for amphetamines. **Journal of Analytical Toxicology**. v. 35, n. 3, p. 183-187, 2011.

WHITEHEAD, P. N. *et al.* Impact of a Dietary Supplement Containing 1,3-Dimethylamylamine on Blood Pressure and Bloodborne Markers of Health: a 10-Week Intervention Study. **Nutrition Metabolic Insights**. v.5, p.33-39, 2012.

YACOUBI, M. E. L. *et al.* The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A_{2A} adenosine receptor antagonists. **Psychopharmacology**. v. 148, p-153-163, 2000.

YOUNG, L. T. C. *et al.* Hemorrhagic stroke in young healthy male following use of sports supplement Jack3d. **Military Medicine**. v. 177, n.12, p.1450–1454, 2012.

ZHANG, Y. *et al.* 1,3-Dimethylamylamine (DMAA) in supplements and geranium products: Natural or synthetic?. **Drug Testing and Analysis**. v. 4, n. 12, p. 986-990, 2012.

8 ANEXO I

Artigo científico publicado relacionado ao tema desta dissertação

Zovico et al. *Nutrition & Metabolism* (2016) 13:90
DOI 10.1186/s12986-016-0152-4

Nutrition & Metabolism

RESEARCH

Open Access

Effects of controlled doses of Oxyelite Pro on physical performance in rats



Paulo Vinícios Camuzi Zovico¹, Victor Magalhães Curty¹, Marcos André Soares Leal¹, Eduardo Frizzera Meira¹, Daniel Ventura Dias², Lívia Carla de Melo Rodrigues¹, Silvana dos Santos Meyrelles¹, Edilamar Menezes De Oliveira³, Paula Frizzera Vassallo¹ and Valério Garrone Barauna^{1*}

Abstract

Background: OxyElite Pro (OEP) is a dietary supplement to increase metabolism which contains as key stimulant the ingredient 1,3-dimethylamylamine (DMAA). Serious adverse effects have been reported after OEP consumption however, these effects are related to poisoning or overdose. To our knowledge, no one studied the effects of OEP at controlled doses. Thus, the aim of this study was to evaluate acute and chronic OEP affects, at controlled doses in Wistar rats, on physical performance, metabolic parameters, liver injury markers and oxidative stress markers and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle.

Methods: Rats were divided in control, 4.3 mg OEP/kg, 12.9 mg OEP/kg and 25.8 mg OEP/kg. All groups were submitted to supplementation with OEP for 4 weeks and the experimental protocols were performed 30 min after the first OEP administration (acute response) and 30 min after the last OEP administration at the end of the fourth week (chronic response).

Results: Running distance and running time increased after acute administration of 12.9 mg OEP/kg (2.6-fold) and 25.8 mg OEP/kg (2.8-fold). Since no effect on the exercise tolerance test was observed at the lower OEP dose (4.3 mg OEP/kg), this group was removed from further analyzes. On other hand, running distance and running time decreased after daily supplementation for 4 weeks also in both groups (64% in 12.9 mg OEP/kg and 72% in 25.8 mg OEP/kg). Chronic supplementation at both 12.9 and 25.8 mg OEP/kg decreased TBARS levels in soleus muscle (36 and 31%) and liver (43 and 25%). AOPP was also decreased by both doses in the liver (39 and 45%). Chronic administration of the highest dose, 25.8 mg OEP/kg, was able to reduce mRNA expression of PGC-1α in soleus muscle (25%). No effect was found in other analyses such as spontaneous physical activity, body weight, food and water intake, hepatic toxicity, cardiac oxidative stress and mitochondrial DNA amount.

Conclusion: Maximum and not recommended doses of OEP ingested acutely presented stimulating effect on the ability to exercise. However, its daily consumption for 4 weeks showed antioxidant effects in soleus muscle and liver which may have decreased the PGC-1α mRNA expression on soleus muscle and contributed to the impaired performance in the exercise tolerance test.

Keywords: Dietary supplements, Performance, Liver, Oxidative stress, Mitochondrial biogenesis

* Correspondence: valerio.barauna@ufes.br

¹Department of Physiological Sciences, University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Vitória 29043-900, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2016 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Dietary supplements are a great business worldwide. Since 2004 the supplements industry increased their sales, reaching an approximate value of 61 billion in 2008 only in USA. The sale of dietary supplements continue to increase in popularity, with 80% of adults in the United States buying at least 1 supplement yearly [1]. The number of supplements found on the market increased from 4,000 in 1994 to more than 55,000 products in 2012 [2]. These supplements are sold with the promise of losing weight and increase physical activity performance [3–5]. Most of these dietary supplements contain one or more ingredients capable of stimulating the Central Nervous System (CNS).

OxyElite Pro (OEP) is a dietary supplement produced by the USP Lab (USPLabs, Dallas, TX) and contains a mixture of plant-derived extracts, commercialized in order to aid in weight loss and improve physical performance [5, 6]. The OEP contains a combination of several ingredients that promises to increase metabolism and lipolysis. Among its composition a key ingredient 1,3 dimethylamylamine, also known as geranium, geranine or DMAA is found [6]. DMAA is a simple aliphatic amine found naturally in geranium flowers (Genus *Geranium*). It is a central nervous system stimulant that induces transient sympathomimetic effects, acting as a norepinephrine reuptake inhibitor and norepinephrine releasing agent [6–8].

DMAA was initially used as a nasal decongestant called Forthane® by the pharmaceutical laboratory Eli Lilly, ending its use in 1983 [9]. Registered as geranine the DMAA reappeared on the market in 2006 as an ingredient in various dietary supplements [10]. However, several adverse effects began to be associated with the use of products containing DMAA. After these reports, discussions on the origin of DMAA were questioned as to the possibility of this substance be of natural origin or not. Consequently, studies began to investigate geranium plants to identify the presence of DMAA and determine the amount of this substance. In contradiction, some studies found DMAA in geranium plants (funded by USPLabs) [11, 12] and others did not identify the DMAA being of native origin [13, 14]. In addition, the amount of DMAA found in plants was lower than the amount found in dietary supplements.

In April 2013, the Food and Drug Administration (FDA) banned the commercialization of dietary supplements containing DMAA due to the controversy on the amount of DMAA found in plants and into the supplements [4]. However, DMAA has still been found in the general public. DMAA was detected in 25% urine samples collected from portable street urinals in central London [15, 16].

Although some studies have already been performed in humans as described, only 1 study was performed in animal model and only 1 study in cell culture [6, 10], showing the lack of mechanistic studies. Also, studies showing that those supplements are safe and well tolerated were from groups sponsored by its manufacturer, the USP labs [1, 3, 17, 18]. On the other hand, those studies showing serious adverse effects associated with OEP consumption were associated with poisoning or ingestion of a huge or unadvertised amount of the supplement. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of known doses of OEP on physical performance, skeletal muscle oxidative stress and metabolism in animal model.

Methods

Experimental groups

Male Wistar Rats (*Rattus Norvegicus Albinus*) 6 weeks-old were obtained from the Federal University of Espírito Santo animal care, Brazil. Rats were kept in groups of five in plastic cages with controlled temperature (22–23 °C), light–dark cycle of 12:12-h, with free access to food and water. All protocols and surgical procedures used were in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Espírito Santo (CEUA-UFES, Protocol 007/2015).

OEP dosages were determined in accordance to doses recommended on the label of the OEP: 1 capsule to 70 kg-adult body weight (i.e. 4.3 mg/kg). Animals were randomly separated into four groups: control group (Vehicle-5% tween20), 4.3 mg OEP/kg (equivalent to 1 capsule, the minimum recommended dosage per day), 12.9 mg OEP/kg (equivalent to 3 capsules, the maximum recommended dosage per day) and 25.8 mg OEP/kg (equivalent to 6 capsules, overdose and not recommended). OEP was diluted in 5% Tween20 and orally administered by gavage.

Rats were daily supplemented for 4 weeks. Acute data were obtained 30 min after the first OEP administration while chronic data were obtained after 4 weeks supplementation. The same animals were used in both protocols. Since no difference was observed in the exercise capacity after acute 4.3 mg OEP/kg administration, this dose was not administered for 4 weeks.

At the end of the experimental period, rats were anesthetized with an i.p injection of a combination of 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine, and were euthanized via intravenous (i.v) ketamine injection. Plasma was collected and stored at –80 °C for later analysis. At the end of the protocol, skeletal muscle (soleus and gastrocnemius), heart, liver and adrenal glands samples were surgically removed. The tissues were weighed,

washed in a solution of Phosphate Buffered Solution and stored at -80°C .

Open field test

Open field test was used to assess spontaneous physical activity as previous published by Rosic et al. [19]. The open field apparatus consisted of a black acrylic enclosed square arena of $43,2\text{ cm} \times 43,2\text{ cm}$ closed by a wall of $30,5\text{ cm}$ high. At beginning of the test each rat was placed in the center of the arena. Rat movements were recorded by a digital video camera placed centrally above the open field for 5 min and analyzed using AnyMaze software. Spontaneous physical activity was assessed 30 min after the first OEP administration (acute response) and 30 min after the last OEP administration at the end of the forth week protocol (chronic response).

Exercise Tolerance Test (ETT)

Exercise capacity was determined by graded treadmill exercise test, a method used for detecting exercise intolerance as previous used by our group [20]. Rats were adapted to treadmill exercises for 3 consecutive days with a gradual speed increase (7 m/min, 9 m/min and 13 m/min, without inclination, for 10 min each day). Forty-eight hours after the adaptation period, rats were placed in the exercise streak and allowed to acclimatize for at least 30 min. Exercise began at 7 m/min with no grade and increased by 3 m/min every 3 min thereafter until exhaustion. The ETT was performed following the open field test.

Food and water intake

Rats were placed in individual metabolic cages (Tecniplast 304) during 48 h for analysis of food and water consumption as previous published by Berger et al. [21]. The first 24 h were used for adaptation and the following 24 h were used to record food and water intake. Metabolic cage was performed 30 min after the first OEP administration (acute response) and 30 min after the last OEP administration at the end of the forth week protocol (chronic response).

Oxidative stress

The levels of lipid peroxidation were determined using the thiobarbituric-acid reactive substances (TBARS) spectrophotometric assay based on the reaction between malondialdehyde (MDA) and triobarbituric acid (TBA) as previous described by our group Leal et al. [22]. Briefly, the samples were homogenized with trichloroacetic acid and butylated hydroxytoluene. After being vortexed, the samples were placed in dry bath and then centrifuged. The upper phase was diluted with triobarbituric acid and placed in dry bath for 30 min,

and the upper phase was read at 532 nm using a spectrophotometer.

Additionally, the advanced oxidation protein products (AOPP) assay protocol was used to evaluate the oxidation of proteins as previous described [22]. Briefly, samples were diluted with phosphate buffer solution, potassium iodide (KI) and acetic acid, vortexed for 6 min and then measured at 340 nm. Chloramine-T absorbance at 340 nm was used as standard curve (0 to 100 μM). Total protein content was determined by the Bradford method.

Toxicity

Alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and γ -glutamyltransferase (GGT) enzymes activities were measured in plasma, using commercially available kits from Bioclin (Brazil), in accordance with the manufactures' instructions. A standard curve was constructed using stock solution of transaminases and the substrates. All samples of transaminases were measured at 505 nm and GGT was measured at 405 nm.

mRNA quantification using real-time PCR

The relative gene expression of Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 alpha (PGC-1 α) was analyzed by real-time PCR. Frozen LV and skeletal muscles samples were homogenized in Trizol and total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technologies, Strathclyde, UK). Total RNA concentration and integrity were assessed and real-time PCR was performed. The mRNA expression was assessed by oligonucleotides primers as follows: PGC-1 α , 5'-ACC AAA CCC ACAGAGAACAG-3' and 5'-GGGT CAGAGGAAGAGATAAAGTTG-3'. The expression of cyclophilin A, 5'-AATGCTGGACCAAAACACAAA-3' and 5'-CCT TCTTTCACCTTCCCAAA-3'; was measured as an internal control for sample variation in RT reaction. Quantification of the target genes expression was performed with a SYBRgreen PCR Master Mix (Applied Biosystem, CA, USA). The relative expression of the mRNA was performed by real-time PCR in the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem).

Mitochondrial DNA assay

Mitochondrial to nuclear DNA ratio was used to estimate mitochondrial copy number in skeletal muscle tissue. Skeletal muscles DNA were extracted using Trizol following manufacturer instructions (Invitrogen Life Technologies, Strathclyde, UK). DNA template was amplified by real-time PCR to determine relative mitochondrial and nuclear DNA quantity using SYBRgreen PCR Master Mix (Applied Biosystem, CA, USA). The following primers for ND1 gene (NADH dehydrogenase

subunit 1) 5'-TCGGAGCCCTACGAGCCGTT-3' and 5'-AGGGAGCTCGATTGTTTCTG-3'; and for nucleus-encoded 18S RNA gene, 5'-TAGTTGGATCT TGGGAGCGGG-3' and 5'-CCGCGGTCCTATTCCAT TATT-3 were used. The expressions of the mitochondrial and nuclear DNAs were performed by real-time PCR in the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem).

Statistical analysis

The values are expressed as means \pm SEM. ETT, Open Field and Body weight were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test. Food and water intake, AST, ALT and GGT, and oxidative stress were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's *post hoc* test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical software SPSS version 22.0 was used for all analysis.

Results

Exercise Tolerance Test (ETT)

OEP stimulatory effect on exercise capacity was studied using the ETT. Figure 1 shows ETT after acute and chronic OEP supplementation. Running distance (Control, 118 ± 16 ; 4.3 mg OEP/kg, 159 ± 37 ; 12.9 mg OEP/kg, 313 ± 42 ; 25.8 mg OEP/kg, 334 ± 48 , meters, $p < 0.01$, Fig. 1a) and running time (Control, 10.7 ± 0.9 ; 4.3 mg OEP/kg, 13.9 ± 1.9 ; 12.9 mg OEP/kg, 20.5 ± 1.7 ; 25.8 mg OEP/kg, 21.1 ± 2.3 , minutes, $p < 0.01$, Fig. 1b) increased only after acute 12.9 mg/kg and 25.8 mg OEP/kg administration. No difference was observed in 4.3 mg OEP/kg and thus this group was not maintained in the chronic protocol.

When rats were daily supplemented for 4 weeks with 12.9 mg/kg or 25.8 mg/kg OEP, running distance (Control, 228 ± 66 ; 12.9 mg/kg OEP, 79 ± 6 ; 25.8 mg/kg OEP,

65 ± 4 , meters, $p < 0.01$, Fig. 1a) and running time (Control, 16 ± 3.2 ; 12.9 mg/kg OEP, 8.3 ± 0.5 ; 25.8 mg/kg OEP, 7.4 ± 0.3 , minutes, $p < 0.01$, Fig. 1b) decreased compared to control group.

These data suggest a positive effect of acute OEP supplementation but a negative effect on exercise capacity when OEP is administered continuously for 4 weeks (chronic).

Spontaneous physical activity

Spontaneous physical activity was measured using the open field test (Fig. 2). No significant difference was observed among groups in any of the parameters analyzed: total running distance (Fig. 2a), mobile time (Fig. 2b) and total lines crossed (Fig. 2c). Although not statistically different from Control group, there was a clear tendency to increase spontaneous physical activity after acute OEP supplementation at dose of 12.9 mg/kg OEP while there was tendency to decrease spontaneous physical activity when the higher dose of OEP was supplemented for 4 weeks (Fig. 2, black bars).

Metabolic parameters and tissue mass

OEP is also a well-known dietary supplement for weight loss. Body weight was analyzed throughout the 4 weeks protocol while water and food intake were analyzed during the first 24 h after the first OEP administration (acute) and during 24 h after the last week of the chronic administration protocol (Table 1).

Body weight was not different among groups at the beginning or at the end of the protocol (Table 1). In agreement, no difference in food or water intake was observed among groups after acute administration or after 4 weeks OEP supplementation measured by the metabolic cage (Table 1). Altogether there is no evidence that either acute or chronic OEP supplementation

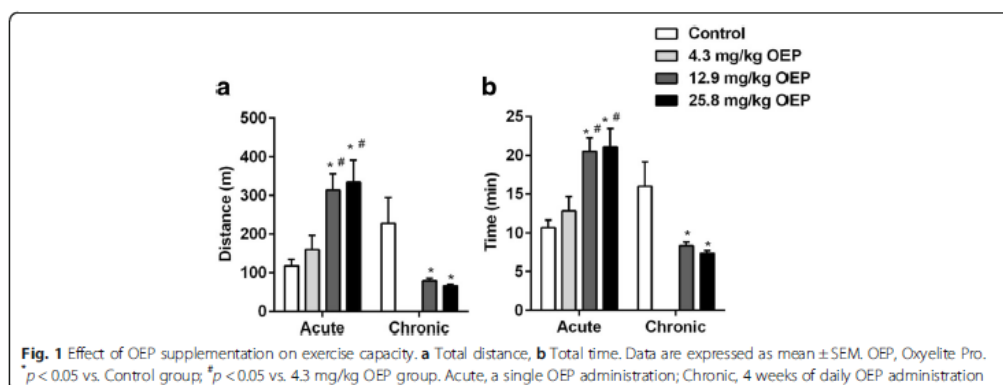
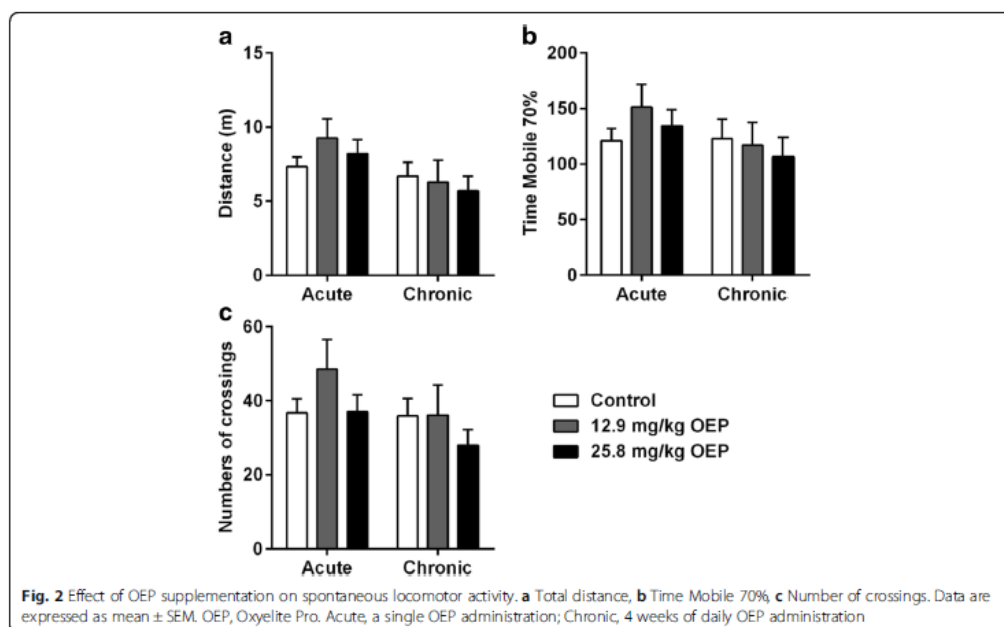


Fig. 1 Effect of OEP supplementation on exercise capacity. **a** Total distance, **b** Total time. Data are expressed as mean \pm SEM. OEP, Oxyelite Pro. * $p < 0.05$ vs. Control group; # $p < 0.05$ vs. 4.3 mg/kg OEP group. Acute, a single OEP administration; Chronic, 4 weeks of daily OEP administration



inhibits appetite or aids to decrease body weight at least in normal feed rats.

Also, at the end of the chronic protocol (4 weeks), gastrocnemius (Control, 4.3 ± 0.13 ; 12.9 mg/kg OEP, 4.4 ± 0.13 ; 25.8 mg/kg OEP, 4.6 ± 0.16 , g/BW), soleus (Control, 0.41 ± 0.010 ; 12.9 mg/kg OEP, 0.45 ± 0.012 ; 25.8 mg/kg OEP, 0.43 ± 0.014 , mg/BW), heart tissue (Control, 3.1 ± 0.05 ; 12.9 mg/kg OEP, 3.2 ± 0.06 ; 25.8 mg/kg OEP, 3.1 ± 0.06 , g/BW), and adrenal glands (Control, 0.081 ± 0.004 ; 12.9 mg/kg OEP, 0.078 ± 0.005 ; 25.8 mg/kg OEP, 0.073 ± 0.004 , mg/BW) were weighed and no differences among groups were observed.

Liver injury markers

Cases of acute hepatitis and liver injury were related to the use of OEP, however the amount of OEP ingestion was reported as unknown or at high doses [4, 5, 23]. Other studies with long-term supplementation but with

known amount of OEP found no difference in liver injury markers (AST, ALT and GGT) [3, 17, 24].

Circulating liver injury markers AST, ALT and Gama-GT were also measured at the end of the chronic protocol. Fig. 3a shows similar levels of AST (Control, 54 ± 3 ; 12.9 mg/kg OEP, 55 ± 5 ; 25.8 mg/kg OEP, 55 ± 2 , U/ml) and ALT (Control, 36 ± 4 ; 12.9 mg/kg OEP, 37 ± 6 ; 25 mg/kg OEP, 31 ± 2 , U/ml) among groups, while Fig. 3b shows no differences in the Gama-GT levels (Control, 6.2 ± 0.4 ; 12.9 mg/kg OEP, 6.9 ± 0.5 ; 25.8 mg/kg OEP 6.4 ± 0.4 , U/ml).

Oxidative stress parameters

Tissue and circulating lipid peroxidation (TBARS, Fig. 4a) and protein oxidation (AOPP, Fig. 4b) were analyzed after 4 weeks OEP supplementation. Plasma, TBARS and AOPP was similar among groups.

Also, red and white gastrocnemius, and heart were similar among groups. However, OEP at both doses

Table 1 Effect of OEP supplementation

Group	Body Weight (BW) (g)		Food intake/BW (mg/g)		Water intake/BW (ml/g)	
	0 WK	4 WK	Acute	Chronic	Acute	Chronic
Control	177 \pm 9	318 \pm 9	102 \pm 5	73 \pm 5	0.145 \pm 0.009	0.104 \pm 0.006
12.9 mg/kg OEP	176 \pm 9	314 \pm 9	98 \pm 5	77 \pm 6	0.137 \pm 0.005	0.111 \pm 0.008
25.8 mg/kg OEP	163 \pm 9	298 \pm 8	99 \pm 5	65 \pm 7	0.143 \pm 0.010	0.098 \pm 0.007

OEP Oxyelite Pro. Acute, a single OEP administration; Chronic, 4 weeks of daily OEP Administration. Data are expressed as mean \pm SEM
Analysis on body weight, and food and water intake

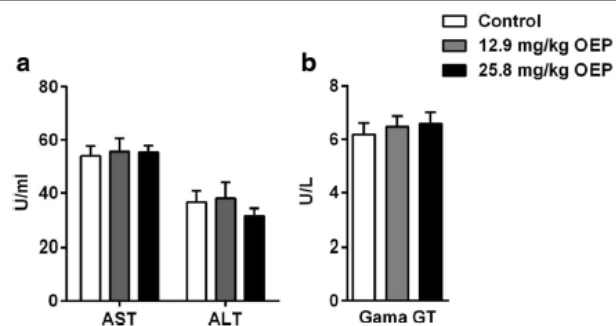


Fig. 3 Effect of OEP supplementation on liver injury markers. **a** Aspartate Transaminase, AST; and Alanine Transaminase, ALT; **b** γ -glutamyltransferase, Gama-GT. Data are expressed as mean \pm SEM. OEP, Oxyelite Pro

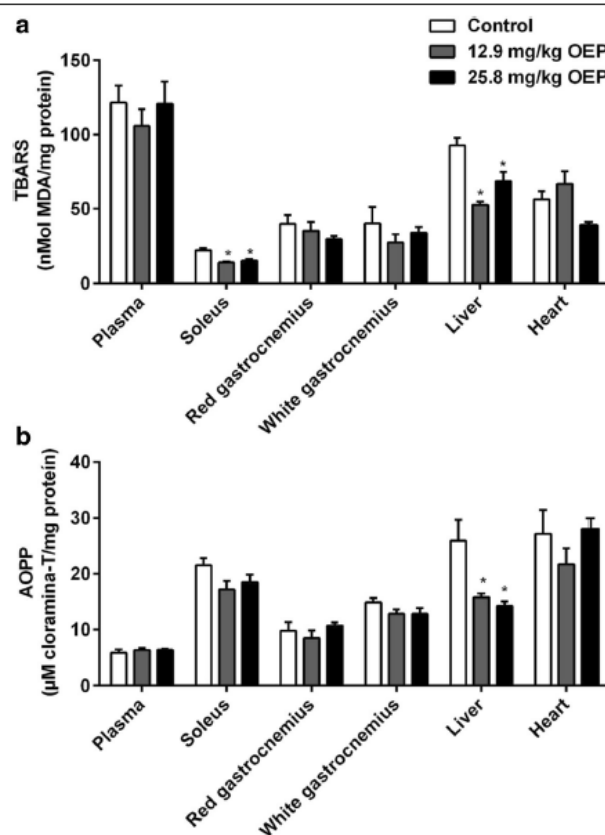


Fig. 4 Effect of OEP supplementation on circulating and tissue oxidative stress markers. **a** Lipid peroxidation, **b** Protein oxidation. Data are expressed as mean \pm SEM. TBARS, thiobarbituric-acid reactive substances; AOPP, advanced oxidation protein products; * $p < 0.05$ vs. Control group

decreased lipid peroxidation in soleus muscle (12.9 mg/kg, 36%; 25.8 mg/kg, 31%) while only a tendency to decrease was observed on protein oxidation (12.9 mg/kg, 20%; 25.8 mg/kg, 15%; $p = 0.11$).

Hepatic oxidative stress markers were also decreased by both doses (TBARS; 43% in 12.9 mg/kg OEP and 25% in 25.8 mg/kg OEP; and AOPP; 39% in 12.9 mg/kg OEP and 45% in 25.8 mg/kg OEP).

Mitochondrial Biogenesis

PGC-1 α mRNA expression (Fig. 5a) ND1 DNA amount (Fig. 5b) were measured after 4 weeks of OEP supplementation in soleus muscle, which has predominantly oxidative fibers. PGC-1 α mRNA expression decreased 25% in 25.8 mg/kg OEP group compared to control group, but no difference was observed in 12.9 mg/kg OEP group (Fig. 5a). ND1 DNA expression, marker of total mitochondria content, was not modified among groups (Fig. 5b).

Discussion

The findings from our study indicate that a single OEP administration stimulated exercise performance (12.9 and 25.8 mg/kg), while chronic administration for 4 weeks of OEP decreased physical activity. Chronic administration of OEP decreased oxidative stress markers in soleus and liver tissues and decreased PGC-1 α mRNA expression. Lastly, OEP supplementation did not change body weight, food and water intake, hepatic injury markers (AST, ALT, Gama-GT) and skeletal muscle total mitochondria amount.

OEP was mainly sold as fat burner and to assist in rapid weight loss. In the present study we found no difference in body weight and food intake of the animals supplemented with OEP. However, data found in the literature are controversial on this subject. The effect of OEP in reducing body weight and appetite was described

with 1 or 2 serving doses during 8 weeks by McCarthy et al. [3], and after 2 weeks by Farney et al. [24]. However, it is noteworthy that the subjects of both studies were regularly engaged in physical activity protocols (which may have contributed to the weight loss) and both studies were financed by USP Labs, the OEP manufacturer. Also, our results corroborate with data found by Whitehead et al. [17], that no effect on body weight was observed with supplementation of 1–3 serving OEP during a period of 10 weeks without exercise training.

In our study, OEP showed no significant effect on spontaneous locomotor activity. Although none has yet studied OEP on spontaneous locomotor activity before, Dolan et al. [10] studied the effects of isolated DMAA, one of several ingredients in OEP, on mice spontaneous activity. The authors observed that acute DMAA administration induced depressant effects within 0 to 30 min which lasted for 50 to 70 min, but increased locomotor activity after 120 to 180 min. This apparently disparate data may be attributed to the fact that the dietary supplement OEP has undetermined amount of DMAA and also has caffeine on its formulation, which biased this comparison.

Acute OEP administration at both 12.9 and 25.8 mg/kg doses but not 4.3 mg/kg OEP increased exercise capacity. Bloomer et al. [25] did not observe effect on running time in humans after acute ingestion of DMAA or its combination with caffeine. However, the authors reported that their results may have been biased due to previously daily use of caffeine throughout the protocol informed by the participants. Stimulatory effects of acute ingestion of 6 mg/kg caffeine in rats and 5 mg/kg caffeine in humans has been demonstrated [26]. Also, acute ingestion of 3 mg/kg caffeine or more is capable to improve physical performance and endurance in humans and animals [27]. Due to the lack of data explaining DMAA effects, these findings with caffeine from

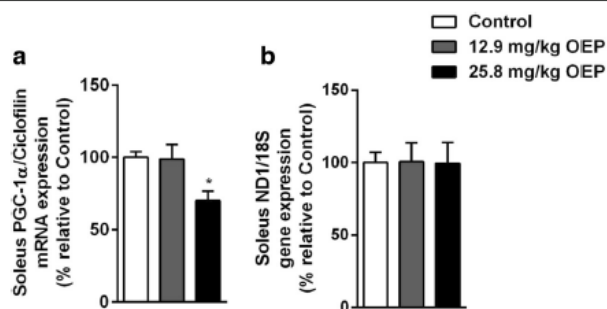


Fig. 5 Effect of OEP supplementation on mitochondrial biogenesis markers. **a** PGC-1 α mRNA expression, **b** ND1 DNA amount. Data are expressed as mean \pm SEM. PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1- α ; ND1, NADH dehydrogenase subunit 1; * $p < 0.05$ vs. Control group

literature could at least partially explain our results. Each OEP capsule contain 100 mg of caffeine and consequently the dosage used in both studied groups with higher concentration of OEP had at least 3 mg/kg of caffeine, the necessary dose to increase physical activity acute consumption [26, 27]. Thus, we believe that the stimulatory effect observed after acute OEP administration is more likely due to caffeine in the supplement instead of the DMAA amount.

Oppositely to findings from acute administration, 4 weeks of OEP harmed exercise performance. Vaughan et al. [6] observed increase in PGC-1 α mRNA and protein expression, and mitochondrial biosynthesis in skeletal muscle cells after 24 and 48 h of OEP incubation. We found, *in vivo*, decreased PGC-1 α mRNA expression and unchanged mitochondrial content in the soleus muscle, the main oxidative muscle of rat hind limb. Data from both studies are difficult to compare since they used a cell culture model and doses of OEP that cannot be translated to the recommended doses in humans [6].

The antioxidant effect of OEP observed in our data (reduced levels of MDA and AOPP in soleus muscle and liver) may at least partially explain the decreased exercise performance and PGC1 α expression. PGC-1 α is a major regulator of energy metabolism and of mitochondrial biogenesis [28]. ROS are essential signaling molecules that contribute to up-regulation for the expression of several genes, including genes related to mitochondrial biogenesis [29]. There is evidence for an antioxidant role of caffeine. Barcelos et al. [30] showed that long-term caffeine consumption reduced MDA levels in the liver of exercise-trained rats [30], while Gomez-Cabrera et al. [29] showed that 8 weeks of antioxidant supplementation decreases endurance capacity (running time), mitochondrial biogenesis and expression of key transcription factors involved in mitochondrial biogenesis. However, there are also studies demonstrating that caffeine increases mitochondrial biogenesis markers as PGC-1 α and improves mitochondrial function and biogenesis [31–33]. In addition, we cannot exclude the antioxidant effects of OEP as previously described by McCarthy et al. [3]. The authors observed lower plasmatic MDA levels than placebo after OEP supplementation for 8 weeks with 2 serving doses. Finally, since OEP contains a mixture of ingredients we cannot exclude possible antioxidant effects of other ingredient in the OEP formula.

Serious effects reported in the literature have been associated with use of products containing DMAA which include tachycardia, nausea, vomiting, agitation, tremor, dizziness, headache, confusion, drowsiness, chest pain, palpitations, slurred speech [24, 34]. More serious and life-threatening effects also have been reported, such as acute myocardial infarction [35], cardiac arrest [36], hemorrhage stroke [37–39] and death [16, 40]. In

addition, hepatotoxic effects were associated with the use of OEP as: acute hepatitis and liver injury [23]. However, the doses used in these studies are high or unknown and, in many cases, were associated with the use of alcohol, other drugs or strenuous physical exercise. On the other hand, similar to our findings, other studies have observed no difference in the liver injury markers (AST, ALT and GGT) [3, 17, 24, 25]. Differently from the studies that observed hepatotoxicity effects, these studies also used controlled doses of OEP recommended in the product label and were not associated with any other drugs.

In summary, our study is the first one to use the recommended dose of OEP in animal model. We did not observe such adverse effects related on literature mainly because those responses are associated with unknown or uncontrolled doses of OEP consumption. Also, we did not observe the weight loss effect of OEP as promised in the product label. On the other hand we observed that acute administration of OEP increased physical performance, while its chronic administration for 4 weeks decreased its performance. We believe that the antioxidant effect, observed by decreased TBARS and MDA, may have contributed to the decreased PGC-1 α expression and thus decreased aerobic performance in chronic consumption. Another possible mechanism is the rats tolerance to the supplement compounds, mainly to the caffeine as already demonstrated [41].

One limitation of this study was that our experiments were performed using a non-obese rat model. It would also be interesting to examine the effects of OEP in obese or overweight rat model. Further research is needed to elucidate the effects of OEP on these models.

Conclusion

Our results suggest that doses maximum and not recommended of OEP ingested acutely presents a stimulating effect on the ability to exercise. However, the use of these doses for 4 weeks showed antioxidant effects in the soleus muscle and liver. Also, consumption of doses greater than the recommended amount may have contributed to suppressed soleus PGC-1 α mRNA expression and reduced physical performance of supplemented animals.

Abbreviations

ALT: Alanine transaminase; AOPP: Advanced oxidation protein products; AST: Aspartate transaminase; CEUA: Ethics committee of the Federal University of Espírito Santo; CNS: Central nervous system; DMAA: 1,3 dimethylamylamine; ETT: Exercise tolerance test; FDA: Food and drug administration; GGT: Gamma-glutamyltransferase; KI: Potassium iodide; MDA: Malondialdehyde; ND1: NADH dehydrogenase subunit 1; OEP: OxyElite pro; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 α ; TBA: Thiobarbituric acid; TBARS: Thiobarbituric-acid reactives substances; UFES: Federal University of Espírito Santo

Acknowledgements

We would like to thanks the BIOCLIN that kindly provided the biochemical kits to analysis. We also would like to thanks Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABION).

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES-67659551/2014) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Availability of data and material

Please contact author for data requests.

Authors' contributions

PVCV, DVD, EMO, VGB: conception and design of research. PVCV, VMC, MASL, EFM: performed experiments. PVCV, VMC, MASL, EFM: analyzed data. PVCV, LCM, PFV, VGB: interpreted results of experiments. PVCV, VMC: Drafted manuscript. PVCV, VMC, MASL, EFM, DVD, SSM, LCM, EMO, PFV, VGB: edited and revised manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

All authors declare that there are no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Animal experimentation was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Espírito Santo (CEUA-UFES, Protocol 007/2015).

Author details

¹Department of Physiological Sciences, University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Vitória 29043-900, Brazil. ²UNIPAMPA, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Brazil. ³School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

Received: 17 October 2016 Accepted: 30 November 2016

Published online: 06 December 2016

References

- McCarthy CG, Farney TM, Canale RE, Alleman RJ. A Finished Dietary Supplement Stimulates Lipolysis and Metabolic Rate in Young Men and Women. *Nutr Metab Insights*. 2011;5:23–31.
- Geller AI, Shehab N, Weidie NJ, Lovegrove MC, Wolpert BJ, Timbo BB, et al. Emergency Department Visits for Adverse Events Related to Dietary Supplements. *N Engl J Med*. 2015;373:1531–40.
- McCarthy CG, Canale RE, Alleman RJ, Reed JP, Bloomer RJ, McCarthy CG, et al. Biochemical and Anthropometric Effects of a Weight Loss Dietary Supplement in Healthy Men and Women. *Nutr Metab Insights*. 2012;5:13–22.
- Roytman MM, Pörzgen P, Lee CL, Huddleston L, Kuo TT, Bryant-Greenwood P, et al. Outbreak of Severe Hepatitis Linked to Weight-Loss Supplement OxyELITE Pro. *Am J Gastroenterol*. 2014;109:1296–8.
- Johnston DI, Chang A, Viray M, Chatham-Stephens K, He H, Taylor E, et al. Hepatotoxicity associated with the dietary supplement OxyELITE Pro™ - Hawaii, 2013. *Drug Test Anal*. 2016;8:319–27.
- Vaughan R, Garcia-Smith R, Barberena M, Bisoffi M, Trujillo K, Conn C. Treatment of human muscle cells with popular dietary supplements increase mitochondrial function and metabolic rate. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9:101.
- Vorce SP, Holler JM, Cawse BM, Maglulio J. Dimethylamylamine: a drug causing positive immunoassay results for amphetamines. *J Anal Toxicol*. 2011;35:183–7.
- Bloomer RJ, Farney TM, Harvey IC, Alleman RJ. Safety profile of caffeine and 1,3-dimethylamylamine supplementation in healthy men. *Hum Exp Toxicol*. 2013;32:1126–36.
- Venhuis BJ, De Kaste D. Scientific opinion on the regulatory status of 1,3-dimethylamylamine (DMAA). *Eur J Food Res Rev*. 2012;2:93–100.
- Dolan SB, Gatch MB. Abuse liability of the dietary supplement dimethylamylamine. *Drug Alcohol Depend Elsevier Ireland Ltd*. 2015; 146:97–102.
- Fleming HL, Ranaivo PL, Simone PS. Analysis and confirmation of 1,3-DMAA and 1,4-DMAA in geranium plants using high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry at ng/g concentrations. *Anal Chem Insights*. 2012;7:59–78.
- Li JS, Chen M, Li ZC. Identification and quantification of dimethylamylamine in geranium by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chem Insights*. 2012;7:47–58.
- Zhang Y, Woods RM, Breitbach ZS, Armstrong DW. 1,3-dimethylamylamine (DMAA) in supplements and geranium products: natural or synthetic? *Drug Test Anal*. 2012;4:986–90.
- Di Lorenzo C, Moro E, Dos Santos A, Uberti F, Restani P. Could 1,3 dimethylamylamine (DMAA) in food supplements have a natural origin? *Drug Test Anal*. 2013;5:116–21.
- Archer JRH, Dargan PI, Lee HMD, Hudson S, Wood DM. Trend analysis of anonymised pooled urine from portable street urinals in central london identifies variation in the use of novel psychoactive substances. *Clin Toxicol*. 2014;52:160–5.
- Archer JRH, Dargan PI, Lostia AM, van der Walt J, Henderson K, Drake N, et al. Running an unknown risk: A marathon death associated with the use of 1,3-dimethylamylamine (DMAA). *Drug Test Anal*. 2015;7: 433–8.
- Whitehead PN, Schilling BK, Farney TM, Bloomer RJ. Impact of a Dietary Supplement Containing 1,3-Dimethylamylamine on Blood Pressure and Bloodborne Markers of Health: a 10-Week Intervention Study. *Nutr Metab Insights*. 2012;5:33–9.
- Schilling BK, Hammond KG, Bloomer RJ, Presley CS, Yates CR. Physiological and pharmacokinetic effects of oral 1,3-dimethylamylamine administration in men. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2013;14:52–61.
- Rosic G, Joksimovic J, Selakovic D, Milovanovic D, Jakovljevic V. Anxiogenic effects of chronic exposure to nandrolone decanoate (ND) at supraphysiological dose in rats: A brief report. *Neuroendocrinol Lett*. 2014;35:703–10.
- Fernandes T, Nakamuta JS, Magalhães FC, Roque FR, Lavini-Ramos C, Schettler IT, et al. Exercise training restores the endothelial progenitor cells number and function in hypertension. *J Hypertens*. 2012;30: 2133–43.
- Berger RCM, Vassallo PF, De Oliveira CR, Oliveira ML, Martins FL, Nogueira BV, et al. Renal effects and underlying molecular mechanisms of long-term salt content diets in spontaneously hypertensive rats. *PLoS ONE*. 2015;10:1–17.
- Leal MA, Balarini CM, Dias AT, Porto ML, Gava AL, Pereira TMC, et al. Mechanisms of Enhanced Vasoconstriction in the Mouse Model of Atherosclerosis: the Beneficial Effects of Sildenafil. *Curr Pharm Biotechnol*. 2015;16:517–30.
- Foley S, Butlin E, Shields W, Lacey B. Experience with OxyELITE Pro and Acute Liver Injury in Active Duty Service Members. *Dig Dis Sci*. 2014;59: 3117–21.
- Farney TM, Jr JA, Bloomer J. Hemodynamic and Hematologic Profile of Healthy Adults Ingesting Dietary supplements containing 1, 3-Dimethylamylamine and Caffeine. *Nutr Metab Insights*. 2012;5:1–12.
- Bloomer RJ, McCarthy CG, Farney TM, Harvey IC. Effect of Caffeine and 1, 3-dimethylamylamine on Exercise Performance and Blood Markers of Lipolysis and Oxidative Stress in Trained Men and Women. *J Caffeine Res*. 2011;1:169–77.
- Ryu S, Choi S, Joung S, Suh H, Cha Y, Lee S, et al. Caffeine as a Lipolytic Performance Food Component in Rats and Athletes. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2001;47:139–46.
- Spiet LL. Exercise and sport performance with low doses of caffeine. *Sports Med*. 2014;44 Suppl 2:S175–84.
- Jornayvaz F, Shulman G. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*. 2010;44:69–84.
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:142–9.
- Barcelos RP, Souza MA, Amaral GP, Stefanelli ST, Bresciani G, Figuera MR, et al. Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. *Life Sci Elsevier Inc*. 2014;96:40–5.
- Ojuka EO, Jones TE, Han D, Chen MAY, Holloszy JO. Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J*. 2003;17:675–81.

32. Moconell GK, Ng GPY, Phillips M, Ruan Z, Macaulay SL, Wadley GD. Central role of nitric oxide synthase in AICAR and caffeine-induced mitochondrial biogenesis in L6 myocytes. *J Appl Physiol.* 2010;108:589–95.
33. Vaughan RA, Garcia-smith R, Bisoffi M, Trujillo KA, Conn CA. Effects of Caffeine on Metabolism and Mitochondria Biogenesis in Rhabdomyosarcoma Cells Compared with 2,4-Dinitrophenol. *Nutr Metab Insights.* 2012;5:59–70.
34. Forrester M. Exposures to 1,3-dimethylamylamine-containing products reported to Texas poison centers. *Hum Exp Toxicol.* 2012;32:18–23.
35. Smith TB, Staub B, Natarajan GM, Lasorda DM, Poornima IG. Acute Myocardial Infarction Associated with Dietary Supplements Containing 1,3-Dimethylamylamine and Citrus aurantium. *Tex Heart Inst J.* 2014;41:70–2.
36. Karnatovskala LV, Leonl JC, Freeman ML. Cardiac Arrest in a 21-Year-Old Man After Ingestion of 1,3-DMAA – Containing Workout Supplement. *Clin. J Sport Med.* 2015;25:2014–6.
37. Gee P, Jackson S, Easton J. Another bitter pill: a case of toxicity from DMAA party pills. *N Z Med J.* 2010;123:124–7.
38. Gee P, Tallon C, Long N, Moore G, Boet R, Jackson S. Use of recreational drug 1,3-dimethylethylamine (DMAA) associated with cerebral hemorrhage. *Ann Emerg Med Elsevier Inc.* 2012;60:431–4.
39. Young C, Oladipo O, Frasier S, Putko R, Chronister S, Marovich M. Hemorrhagic stroke in young healthy male following use of sports supplement Jack3d. *Mil Med.* 2012;177:1450–4.
40. Eliason MJ, Eichner A, Cancio A, Bestervelt L, Adams BD, Deuster PA. Case reports: Death of active duty soldiers following ingestion of dietary supplements containing 1,3-dimethylamylamine (DMAA). *Mil Med.* 2012; 177:1455–9.
41. Holtzman SG, Finn IB. Tolerance to behavioral effects of caffeine in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988;29:411–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



9 ANEXO II

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **007/2015**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Efeitos do uso crônico do estimulante 1,3 dimetilamilaína e cafeína sobre a performance esportiva e adaptações moleculares do músculo esquelético e cardíaco."** que tem como responsável o (a) docente **Valério Garrone Barauna**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 10/04/15.


Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA-UFES

Vitória (ES), 10 de abril de 2015.